

**Funktion des zellspezifischen Transkriptionsfaktors
HNF4 α bei der Zellproliferation und Identifizierung von
HNF4 α -regulierten Genen in Nierenzellen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereiches Biologie und Geographie

an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Dipl. Biochem.

Belén Lucas

aus Bilbao, Spanien

Juni 2005

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. G.U. Ryffel

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Opalka

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD. Dr. B. Siebers

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.05

Teile dieser Arbeit sind in die folgende Publikation eingegangen:

Belén Lucas, Karen Grigo, Silke Erdmann, Jörn Lausen, Ludger Klein-Hitpass and Gerhart U. Ryffel (2005). HNF4 α reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene*. **24**, 6418-6431.

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α	1
1.1	HNF4 α -Funktion in der Leber	5
1.2	HNF4 α -Funktion im Pankreas	5
1.3	HNF4 α -Funktion in der Niere	6
2	HNF4 α -Zielgene	6
2.1	Mikroarray-Studien zur Identifizierung von HNF4 α -Zielgenen	9
3	Funktionsausfall des Transkriptionsfaktors HNF4 α bei Krankheiten des Menschen .	10
3.1	MODY1	11
3.2	Typ2 Diabetes mellitus (T2DM)	11
3.3	Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	12
3.4	Nierenzellkarzinom (NZK)	12
4	Zielsetzung der Arbeit	15
II	Material und Methoden	17
1	Material	17
1.1	Chemikalien, Puffer und Enzyme	17
1.2	Zellkultur	17
2	Molekularbiologische Methoden	17
2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	17
2.2	Plasmide	18
3	Proteinchemische Methoden	19
3.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen	19
3.2	Proteinbestimmung nach Bradford	20
3.3	SDS-Gelelektrophorese	20
3.4	Western Blot	20
4	Zellbiologische Methoden	21
4.1	Auftauen von Zellen	21
4.2	Kulturbedingungen	22
4.3	Subkultivierung von Zellen	22
4.4	Zellzahlbestimmung	22

4.5	Kryokonservierung.....	22
5	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	23
5.1	Methanol-Fixierung.....	23
5.2	Kernfärbung mit Hoechst A 33342	23
5.3	Färbung von Aktinfilamenten mit FITC-Phalloidin.....	24
5.4	GFP-Detektion	24
6	Herstellung stabiler induzierbarer Zelllinien mit dem Flp-In T-REx System.....	24
6.1	Flp-In T-REx 293 Zellen.....	24
6.2	Klonierung des gewünschten Transgens in den pcDNA5/FRT/TO-Vektor	24
6.3	Kotransfektion des pcDNA5/FRT/TO-Vektors und der Flp-Rekombinase mit Lipofectamine.....	25
6.4	Selektion mit Hygromycin	25
6.5	Analyse der hergestellten Zelllinien.....	25
6.6	Induktion mit Tetracyclin.....	26
7	Zellassays	26
7.1	Untersuchung der Morphologie	26
7.2	Untersuchung der Zellproliferation.....	26
7.3	Untersuchung der Apoptose	29
8	Mikroarray.....	30
8.1	RNA-Isolierung für Mikroarray.....	31
8.2	Verwendete Chips	31
8.3	Synthese der cDNA, Markierung und Hybridisierung.....	32
8.4	Auswertung der Daten.....	33
9	Quantitative Real-time PCR.....	33
9.1	RNA-Isolierung.....	34
9.2	cDNA-Synthese.....	34
9.3	Quantitative Real-time PCR mit SYBRGreen, TaqMan-Sonden und TaqMan Low Density Array.....	34
9.4	Berechnung der Genexpression.....	39
10	Gen-Inaktivierung mittels RNAi	39
10.1	siRNA-Kassetten.....	40
10.2	Transiente Transfektion der siRNA-Kassetten	41
10.3	Stabile Transfektion der siRNA-Kassetten	41
10.4	siRNA-Kassette gegen Luziferase als Positivkontrolle	42

III Ergebnisse	43
1 Etablierung und Charakterisierung von HEK293 Zellen, die HNF4 α konditional exprimieren.....	43
2 HNF4 α hemmt spezifisch die Proliferation von HEK293 Zellen.....	49
2.1 HNF4 α führt nicht zu einer Reduktion des prozentualen Anteils der HEK293 Zellen in der S-Phase.....	51
2.2 Die HNF4 α -Expression in HEK293 Zellen führt nicht zu einer Arretierung in einer der Phasen des Zellzyklus	52
2.3 HNF4 α induziert keine Apoptose in HEK293 Zellen.....	53
3 HNF4 α führt zu einer Änderung der Morphologie von HEK293 Zellen	55
4 Reversibilität der durch HNF4 α induzierte Effekte.....	57
5 Konzentrationsabhängigkeit der durch HNF4 α induzierte Effekte	57
6 Die von HNF4 α hervorgerufenen Effekte erfolgen über die Aktivierung von HNF4 α -Zielgenen.....	59
7 Identifizierung von HNF4 α -Zielgenen in HEK293 Zellen.....	61
7.1 HNF4 α -regulierte Gene	63
7.2 HNF4 α R154X- und HNF4 α C106R-regulierte Gene	66
8 Validierung ausgewählter Kandidatengene.....	67
8.1 Validierung mittels Real-time PCR.....	68
8.2 Validierung mittels Western Blot.....	71
9 Analyse der gewebespezifischen Genexpression der identifizierten HNF4 α -Zielgene ..	73
10 Mehrere Gene, die durch HNF4 α in HEK293 Zellen reguliert werden, sind im Nierenzellkarzinom (NZK) dereguliert.....	74
11 Kandidatengene für die Vermittlung der HNF4 α -Effekte	76
12 Überexpression der Kandidatengene WT1, MTM1, SEPP1 und DSC2	77
12.1 Etablierung der Zelllinien, die die Kandidatengene konditional exprimieren	78
12.2 Untersuchung der Proliferation und Morphologie nach Überexpression der Kandidatengene	82
13 Reduktion der Genaktivität der Kandidatengene WT1, MTM1 und VIL1 mittels RNAi	83
13.1 siRNA-Kassetten.....	83
13.2 siRNA-Zelllinien.....	85

IV Diskussion	89
1 Etablierung von HEK293 Zellen, die HNF4 α konditional exprimieren.....	89
2 HNF4 α hemmt die Proliferation der HEK293 Zellen.....	91
3 HNF4 α verändert die Morphologie der HEK293 Zellen.....	93
4 Die von HNF4 α hervorgerufenen Effekte erfolgen über die Aktivierung von HNF4 α -Zielgenen.....	95
5 HNF4 α -regulierte Gene in HEK293 Zellen.....	96
5.1 Bestätigung der potentiell durch HNF4 α induzierter Gene	98
5.2 Mehrere Gene, die durch HNF4 α in HEK293 Zellen reguliert werden, sind im Nierenzellkarzinom dereguliert.....	98
5.3 HNF4 α C106R- und HNF4 α R154X-regulierte Gene	99
6 Kandidatengene für die Vermittlung der HNF4 α -Effekte	100
7 HNF4 α und MODY	101
8 Beteiligung von HNF4 α an der Entwicklung des Nierenzellkarzinoms.....	102
9 Ausblick	105
V Zusammenfassung.....	107
VI Literaturverzeichnis.....	109
VII Anhang	120
1 Mikroarray.....	120
2 Validierung mit dem TaqMan Low Density Array	122
Danksagung.....	125
Publikationsliste	127
Lebenslauf.....	128

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACY1	Aminoacylase
AF	Aktivierungsfunktion
BHD	Birt-Hogg-Dubé Gen
BIRC2	<i>baculoviral IAP repeat-containing 2</i>
BrdU	Bromdesoxyuridine
Brm	Brahma
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CBP	<i>CREB binding protein</i>
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
cDNA	komplementäre DNA
C/EBP α	<i>CCAAT/enhancer-binding protein-α</i>
CFLAR	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>
c-Met	<i>met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)</i>
CMV	Cytomegalievirus
COUP-TF	<i>Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor</i>
cRNA	<i>complementary RNA</i>
C-terminal	carboxyterminal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DSC2	Desmocollin 2
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ELISA	Enzymimmunttest (<i>enzyme-linked-immunoadsorbent-assay</i>)
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
FACS	Durchflusszytometer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	Fötales Kälberserum
FH	Fumarathydratase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GFP	Grün-Fluoreszierendes Protein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GRIP1	<i>glucocorticoid receptor interacting protein 1</i>
HCC	hepatozelluläres Karzinom (<i>hepatocellular carcinoma</i>)
HEK	humane embryonale Nierenzellen (<i>human embryonic kidney cells</i>)
HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
HNF	<i>hepatocyte nuclear factor</i>
HRPO	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
Luc	Luziferase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTM1	Myotubularin 1
MODY	maturity-onset diabetes of the young
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
n.b.	nicht bestimmt
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminotermminus
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacryamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered-saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEPCK	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
PGC-1	<i>peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI	Propidiumjodid
pRB	Retinoblastoma Protein
q	Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEPP1	Selenoprotein P
SHP	<i>small heterodimer partner</i>
Smad	<i>Sma and Drosophila Mothers Against Dpp</i>
SMRT	<i>silencing mediator of retinoid and thyroid receptors</i>
SRC-1	steroid receptor coactivator
Std.	Stunde
T	Thymin
T2DM	Typ2 Diabetes mellitus
Tab.	Tabelle
TGF	<i>Transforming growth factor-β</i>
Tet	Tetracyclin
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
VHL	von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen
VIL1	Villin 1
wt	Wildtyp
WT1	Wilms tumor 1 Protein
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalische Angaben wurden SI- (Internationales Einheitensystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt. Aminosäuren wurden mit dem international gebräuchlichen Einbuchstabencode abgekürzt.

I Einleitung

1 Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α

Hepatocyte Nuclear Factor 4 α (HNF4 α , NR2A1) ist ein hochkonserviertes Mitglied der Kernrezeptor-Familie (Sladek et al. 1990). HNF4 α gehört zur Gruppe A der Subfamilie 2 der Kernrezeptoren (Nuclear Receptors Nomenclature Committee 1999), zu der außer HNF4 α noch der bisher nur in *Xenopus* gefundene Kernrezeptor HNF4 β (Holewa et al. 1997), sowie HNF4 γ (Drewes et al. 1996; Taraviras et al. 2000) gehören. Bis heute sind 49 verschiedene Kernrezeptoren bekannt (Willson and Moore 2002). Die Aktivität vieler Kernrezeptoren wird durch die Bindung von kleinen hydrophoben Liganden, wie Steroidhormonen, Thyroidhormonen, Vitaminen, Fettsäuren und Retinoiden kontrolliert. Aber bei dem größten Teil der Kernrezeptoren handelt es sich um Waisenrezeptoren (orphan receptors), für die kein Ligand identifiziert worden ist. Die Kernrezeptoren regulieren die Transkription durch die Bindung an sogenannten „response elements“ in den regulatorischen Regionen der Zielgene und kontrollieren ein breites Spektrum von physiologischen Prozessen wie Zelldifferenzierung, Wachstum und Lipidhomeostase (Mangelsdorf et al. 1995).

Wie andere Mitglieder der Kernrezeptor-Familie besitzt HNF4 α einen modularen Aufbau aus sechs konservierten Domänen (A-F), die für spezifische Funktionen verantwortlich sind (Abb. I.1). Am aminoterminalen Ende befindet sich die A/B-Domäne mit der Aktivierungsfunktion AF-1. Die AF-1 entspricht die 24 N-terminalen Aminosäuren (Hadzopoulou-Cladaras et al. 1997) und interagiert mit mehreren Koaktivatoren (Green et al. 1998). An die A/B-Domäne schließt sich die DNA-Bindungsdomäne (DBD, C-Domäne) bestehend aus zwei Zinkfingermotiven. Eine flexible D-Region verbindet die DNA-Bindungsdomäne mit der langen hydrophoben Ligandenbindungsdomäne (LBD, E-Domäne). Die LBD ist an der Homodimerisierung, transkriptionellen Aktivierung und Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren beteiligt (Jiang and Sladek 1997; Ktistaki and Talianidis 1997). Die LBD beinhaltet außerdem die Aktivierungsfunktion AF-2 (Hadzopoulou-Cladaras et al. 1997). Die C-terminale F-Domäne ist im Unterschied zu den meisten anderen Kernrezeptoren relativ groß und enthält eine Repressorregion, die den Zugang zu der AF-2 und die Bindung von Koaktivatoren inhibiert (Suaud et al. 1999).

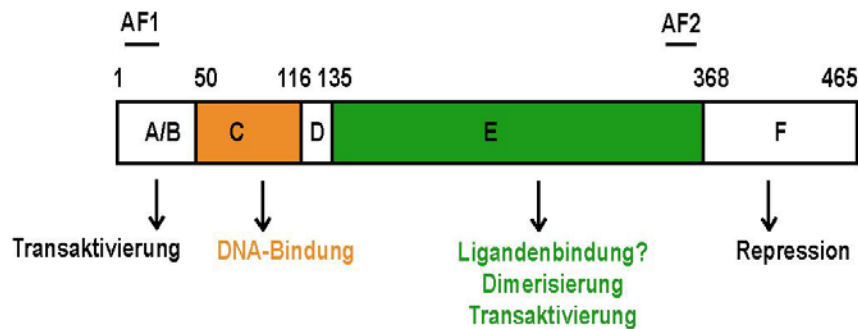


Abb. I.1: Schematische Darstellung der HNF4α-Domänenstruktur. Die weniger gut konservierten Regionen A/B, D und F sind in weiß dargestellt. Die zwei Aktivierungsfunktionen (AFs) sind angezeigt. Die AF-1 ist in der A/B-Domäne und die AF-2 in der E-Domäne lokalisiert. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäuren der humanen Isoform HNF4α2 (nach Sladek und Seidel 2001).

HNF4α wird den sogenannten Waisenrezeptoren, Kernrezeptoren ohne bekannten Liganden, zugeordnet. Einzelne Berichte haben vorgeschlagen, dass langkettige Fettsäuren als Liganden des HNF4α agieren (Hertz et al. 1998; Petrescu et al. 2002; Rajas et al. 2002). Durch Röntgenkristallstrukturanalyse konnte die Bindung von Fettsäuren in der Ligandenbindungsdomäne von HNF4α und HNF4γ bestätigt werden (Dhe-Paganon et al. 2002; Sladek 2002; Wisely et al. 2002). Da aber ein Austausch der Fettsäuren bisher nicht beobachtet wurde, fungieren diese wahrscheinlich als Kofaktoren für die Struktur des Proteins und nicht als klassische regulatorische Liganden (Benoit et al. 2004).

Das HNF4α-Gen des Menschen umfasst ~ 29 kb mit 12 Exons und liegt auf Chromosom 20 bei Position 20q13.1-q13.2 (Argyrokastitis et al. 1997; Drewes et al. 1996). Dessen Transkription wird über zwei unterschiedliche Promotoren, P1 und P2, reguliert. Der Promotor P2 befindet sich ~ 46 kb stromaufwärts von dem zuerst identifizierten P1 Promotor und kontrolliert die HNF4α Transkription in den β-Zellen des Pankreas (Eeckhoute et al. 2003; Thomas et al. 2001). Das HNF4α-Gen kodiert möglicherweise neun unterschiedliche Isoformen. Die Struktur und Nomenklatur sind in Abbildung I.2 dargestellt. Die HNF4α-Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen und durch die alternative Verwendung der zwei Promotoren. Der Promotor P1 initiiert Transkripte, die den Exon 1A enthalten (Isoformen α1-α6), während der Promotor P2 Transkripte mit Exon 1D (Isoformen α7-α9) initiiert (Boj et al. 2001; Thomas et al. 2001). Die Isoformen α2 und α8 sind die alternativen Spleißvarianten der Isoformen α1 und α7 und enthalten eine C-terminale Insertion von 10 Aminosäuren in der F-Domäne. Im Vergleich zu diesen vier Isoformen werden die Isoformen α3 und α9, die eine völlig unterschiedliche 3'-Sequenz haben, viel weniger exprimiert, während die Isoformen α4-α6 sehr wenig exprimiert oder noch nicht *in vivo* identifiziert

worden sind (Furuta et al. 1997; Sladek and Seidel 2001). Die Expression der HNF4 α -Isoformen variiert mit der Entwicklung, Differenzierung und Herkunft des Gewebes. (Nakhei et al. 1998; Sladek and Seidel 2001; Suaud et al. 1997; Torres-Padilla et al. 2001). Dies deutet auf eine unterschiedliche Funktion der verschiedenen HNF4 α -Isoformen hin. Die HNF4 α -Isoformen unterscheiden sich zusätzlich hinsichtlich ihrem Transaktivierungspotential und ihrer Interaktion mit Koaktivatoren. Die Isoformen, die vom P1-Promotor stammen ($\alpha 1$ - $\alpha 6$), enthalten die Aktivierungsfunktion AF-1 und zeigen eine stärkere transkriptionelle Aktivität als die Isoformen aus dem P2-Promotor, wo die AF-1 fehlt (Eeckhoute et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die Isoform HNF4 $\alpha 2$ eingesetzt. Bei dieser Isoform, die in der Mitte der F-Domäne eine Insertion von 10 Aminosäuren trägt, ist die Inhibition der Koaktivatorbindung durch die F-Domäne aufgehoben bzw. die Interaktion mit den Koaktivatoren verstärkt (Sladek et al. 1999).

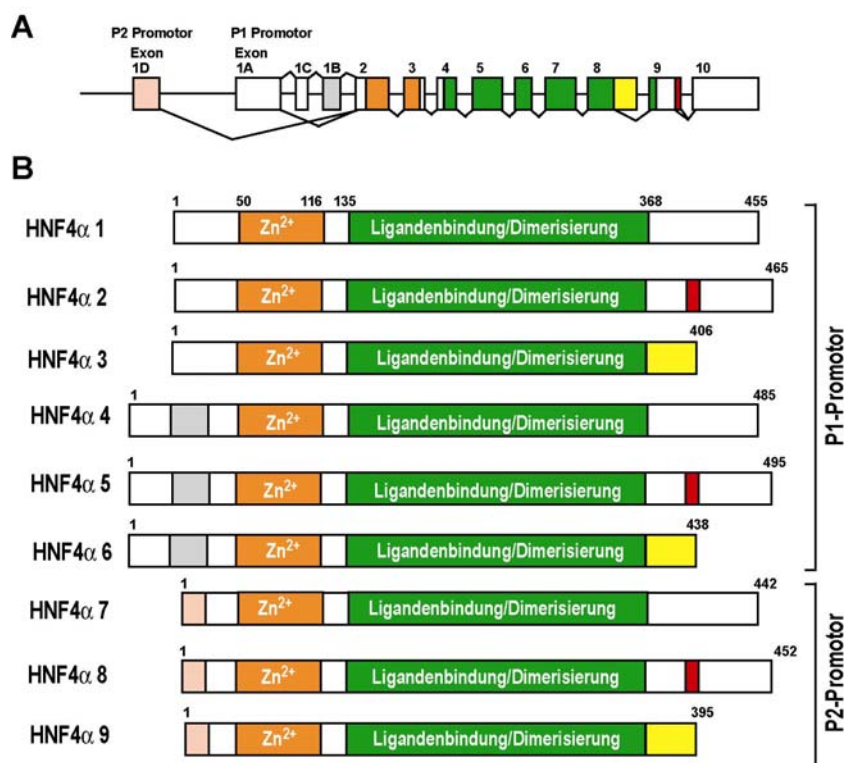


Abb. I.2: HNF4 α -Isoformen. (A) Struktur des humanen HNF4 α -Gens. (B) Struktur der HNF4 α Isoformen, die durch alternatives Spleißen und durch alternative Verwendung der Promotoren P1 und P2 generiert werden. (modifiziert nach Sladek und Seidel 2001).

Der Transkriptionsfaktor HNF4 α fungiert im allgemeinen als konstitutiver transkriptioneller Aktivator und kann in Abwesenheit von einem exogenen Liganden die Transkription aktivieren. Die Aktivität von HNF4 α kann jedoch durch ligandenunabhängige Mechanismen kontrolliert werden. Dessen DNA-Bindungsaktivität kann durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten und Acetylierung moduliert werden. Seine transkriptionelle Aktivität kann durch andere

Transkriptionsfaktoren wie COUP-TF, Smad3 und Smad4, und Koaktivatoren wie GRIP1, SRC-1, CBP, p300 und PGC-1 erhöht (Sladek and Seidel 2001) und durch negative transkriptionelle Partner wie SHP (Lee et al. 2000), p53 (Maeda et al. 2002) und SMRT (Ruse, Jr. et al. 2002) reprimiert werden. Darüber hinaus wird HNF4 α durch den TGF- β -Signalweg hochreguliert (Chou et al. 2003) und durch den Notch-Signalweg herunterreguliert (Tanimizu and Miyajima 2004).

Die HNF4 α Aktivität wird auch durch eine Kaskade von Transkriptionsfaktoren reguliert (Abb. I.3). HNF4 α ist Teil eines Regulationsnetzwerkes aus Transkriptionsfaktoren, welches die Genexpression während der embryonalen Entwicklung und im Erwachsenenalter reguliert. In diesem Netzwerk ist HNF4 α unterhalb der Transkriptionsfaktoren HNF1 α , HNF1 β , HNF3 β , GATA6 und pdx1 angeordnet (Barbacci et al. 1999; Clotman et al. 2003; Duncan et al. 1998; Ferrer 2002; Kuo et al. 1992; Morrissey et al. 1998; Shih et al. 2001).

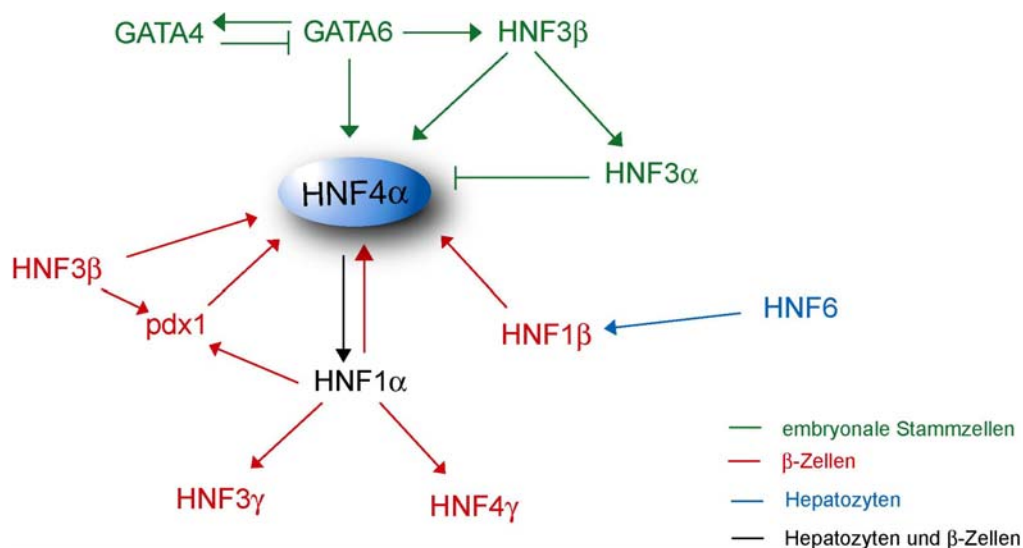


Abb. I.3: HNF4 α ist Teil eines Regulationsnetzwerkes aus Transkriptionsfaktoren. Die verschiedenen Farben zeigen die Zelltypen, wo die jeweilige Regulation nachgewiesen wurde. HNF: hepatocyte nuclear factor; pdx1: pancreatic and duodenal homeobox gene 1; GATA: GATA binding protein (nach Sladek and Seidel 2001, Ferrer 2002 und Shih 2001).

Der Transkriptionsfaktor HNF4 α ist für die normale embryonale Entwicklung essentiell. Er liegt im *Xenopus*-Ei als maternale Komponente vor (Holewa et al. 1996) und wird in der frühen Embryogenese der Säuger exprimiert (Chen et al. 1994; Taraviras et al. 1994). Mäuse ohne funktionelles HNF4 α -Gen sterben in einem sehr frühen Stadium der Embryogenese, da sie aufgrund einer Dysfunktion des viszeralen Endoderms die Gastrulation nicht vollenden können (Chen et al. 1994). Da die Tiere, in denen nur ein Allel des HNF4 α -Gens inaktiviert ist, eine völlig normale Entwicklung zeigen, gibt es im Mausmodell keinen Hinweis auf eine Haploinsuffizienz in Bezug auf HNF4 α .

Im adulten Organismus wird HNF4 α als zellspezifischer Transkriptionsfaktor in der Leber, in der Niere, im Magen-Darmtrakt und im Pankreas exprimiert (Miquerol et al. 1994;Sladek et al. 1990).

1.1 HNF4 α -Funktion in der Leber

Die Funktion von HNF4 α wurde im Detail in der Leber charakterisiert. Durch stabile Transfektion in der Zellkultur und durch die leberspezifische Deletion von HNF4 α im Mausembryo ist demonstriert worden, dass HNF4 α für die normale hepatische Funktion und für die Aufrechterhaltung des differenzierten Phänotyps und der Lipidhomeostase essentiell ist (Hayhurst et al. 2001;Späth and Weiss 1997). HNF4 α beeinflusst in der Leber die Expression zahlreicher hepatischer Gene (s. Tab. I.2). In der Leberentwicklung spielt HNF4 α eine Schlüsselrolle bei der Differenzierung der Hepatozyten, ist aber für die primäre Ausbildung der Leber nicht essentiell (Li et al. 2000). Die leberspezifische Deletion von HNF4 α im Mausembryo zeigte, dass HNF4 α ein essentieller Faktor für die Bildung des hepatischen Epitheliums und der charakteristischen Leberarchitektur darstellt (Parviz et al. 2003). In der adulten Leber wird die HNF4 α -Expression hauptsächlich durch den P1-Promotor initiiert, während in der embryonalen Leber die Expression durch den proximalen P1- und den distalen P2-Promotor reguliert wird (Nakhei et al. 1998;Torres-Padilla et al. 2001). Die wichtigsten Isoformen in der adulten Leber scheinen HNF4 α 1 und HNF4 α 2 zu sein.

1.2 HNF4 α -Funktion im Pankreas

HNF4 α spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in den β -Zellen des Pankreas. In diesen Zellen stellt HNF4 α ein wichtiger Transkriptionsfaktor dar, welcher die Expression von Genen reguliert, die am Glukose-Metabolismus und an der glukoseinduzierten Insulinsekretion beteiligt sind (Wang et al. 2000). Darüber hinaus aktiviert HNF4 α in den β -Zellen direkt den Insulin-Promotor (Bartoov-Shifman et al. 2002). Im Pankreas ist das HNF4 α -Expressionsniveau viel geringer als in der Leber. Dabei wird HNF4 α innerhalb des Pankreas nur in den Langerhans-Inseln exprimiert (Miquerol et al. 1994). In pankreatischen β -Zellen wurden Transkripte von dem P1- und P2-Promotor detektiert (Eckhoute et al. 2003), jedoch scheint der P2-Promotor die primäre Transkriptionsstartstelle zu sein (Boj et al. 2001;Thomas et al. 2001). HNF4 α ist zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren, einschließlich

HNF1 α , in einem komplexen Netzwerk von Transkriptionsfaktoren beteiligt, das für die Funktion der β -Zellen des Pankreas essentiell ist (Abb. I.3) (Ferrer 2002).

1.3 HNF4 α -Funktion in der Niere

Obwohl HNF4 α in manchen Teilen der Niere stark exprimiert wird, bleibt die physiologische Funktion von HNF4 α in diesem Organ noch unbekannt. Genexpressionsprofile aus präparierten Nieren ergaben, dass HNF4 α in den proximalen gewundenen und gestreckten Tubuli reichlich exprimiert wird, während in den anderen Abschnitten der Niere keine signifikante Expression detektiert wurde (Chabardes-Garonne et al. 2003) (NCBI, GEO Profiles, GDS HNF4A). Dieser Befund wurde auf Proteinebene von Jiang et al. bestätigt. Die HNF4 α -Isoformen HNF4 α 1/ α 2/ α 3 wurden durch spezifische Antikörper in den proximalen tubulären Epithelzellen nicht aber in dem Glomerulus so wie in den distalen und Sammelrohr-Epithelzellen detektiert (Jiang et al. 2003). In der adulten Niere wird die Expression von HNF4 α hauptsächlich durch den proximalen P1-Promotor reguliert (Nakhei et al. 1998).

Da HNF4 α für die Funktion der Leber und des Pankreas entscheidend ist, bleibt es von großem Interesse herauszufinden, welche Funktion HNF4 α in der Niere ausübt.

2 HNF4 α -Zielgene

Die transkriptionelle Regulation durch HNF4 α erfolgt durch dessen Bindung als Homodimer an Enhancer- und Promotorbereiche seiner Zielgene. HNF4 α bindet Sequenzen, die als DR1 (direct repeat 1) mit der Sequenz (A/G)GG(T/C)CA und einem beliebigen Basenpaar als Spacer angeordnet sind (Ellrott et al. 2002; Sladek and Seidel 2001).

Mehr als 60 Zielgene von HNF4 α sind in Hepatozyten, β -Zellen des Pankreas und embryonalen Stammzellen identifiziert worden (Sladek and Seidel 2001). Dabei wurden unterschiedliche Ansätze angewendet, um die HNF4 α -Zielgene aufzudecken. Aufgrund von DNA-Bindungsstudien und Transaktivierungsexperimente wurden mehrere direkte Zielgene von HNF4 α identifiziert. Andere experimentelle Ansätze ergaben HNF4 α -regulierte Gene, die nicht direkte sondern nur potentielle Zielgene darstellen. In einem ersten Ansatz wurden Genaktivitäten zwischen Embryonalkörpern, die aus embryonalen Stammzellen von Knockout-Mäusen oder aus normalen Stammzellen hervorgegangen sind, miteinander verglichen (Duncan et al. 1997; Stoffel and Duncan 1997). In einem zweiten Ansatz wurde

HNF4 α bzw. eine dominant-negative Mutante von HNF4 α (DN-HNF4 α) konditional in Insulinoma-Zellen der Ratte (INS-1 Zellen) eingebracht, die als differenzierte β -Zellen des Pankreas endogen HNF4 α exprimieren (Wang et al. 2000). In weiteren Ansätzen wurde HNF4 α in Leberzelllinien stabil exprimiert. Hierbei wurde die Expression in den HNF4 α exprimierenden Zellen mit den Ursprungszelllinien verglichen (Inoue et al. 2001; Späth and Weiss 1997). Weitere potentielle Zielgene wurden durch die Analyse der leberspezifischen HNF4 α Knockout-Maus identifiziert (Hayhurst et al. 2001; Parviz et al. 2003). In allen diesen Ansätzen wurde die Genexpression durch RT-PCR, Northern Blot oder Western Blot analysiert.

Tab. I.1: Ansätze zur Identifizierung von HNF4 α -Zielgenen.

Experimentelles Modell	Referenz
ES-Zellen von HNF4 α Knockout Mäusen.	Duncan et al 1997; Stoffel and Duncan 1997
konditionale Expression von HNF4 α in INS-1 Zellen	Wang et al 2000
Leberzellen, die HNF4 α stabil exprimieren	Inoue et al 2001; Späth and Weiss 1997
Leberzellen aus der leberspezifischen HNF4 α Knockout-Maus	Hayhurst et al 2001; Inoue et al 2002; Parviz et al 2003

Die Analyse der HNF4 α -Zielgene hat ergeben, dass HNF4 α an der Regulation einer Vielzahl von Genen beteiligt ist. Unter den HNF4 α -Zielgenen befinden sich Enzyme des Metabolismus von Glukose, Aminosäuren, Lipiden und xenobiotischen Verbindungen. Darüber hinaus handelt es sich bei vielen HNF4 α -regulierten Genen um Serumproteine, die am Nährstofftransport, an der Blutkoagulation und an der Hämatopoese beteiligt sind. HNF4 α reguliert außerdem die Expression viraler Gene sowie Gene, die an der Immunantwort, Zellstruktur und Harnstoffbildung beteiligt sind. Weiterhin wird die Expression anderer Transkriptionsfaktoren wie HNF1 α oder HNF6 ebenfalls durch HNF4 α reguliert (Sladek und Seidel 2001). Dabei enthält der Promotor von HNF1 α eine HNF4 Bindestelle, und HNF1 α ist in Hepatozyten und in β -Zellen des Pankreas als HNF4 α -Zielgen identifiziert worden (Kuo et al. 1992; Tian and Schibler 1991). In der Tabelle I.2 sind die experimentell belegten direkten HNF4 α -Zielgene und die potentiellen HNF4 α -Zielgene (kursiv) aufgetragen.

Die Mehrheit der bekannten HNF4 α -Zielgene wurde in Hepatozyten identifiziert. In β -Zellen des Pankreas und embryonalen Stammzellen ist ebenfalls eine Reihe von HNF4 α -Zielgenen aufgedeckt worden. Die von HNF4 α regulierten Gene im Magen-Darmtrakt und in der Niere, wo HNF4 α ebenfalls exprimiert wird, bleiben jedoch noch unbekannt.

Tab. I.2: Identifizierte HNF4 α -Zielgene.

Nährstofftransport	
Transport von Lipiden und Retinol	
hApoAI / <i>mApoAI</i>	apolipoprotein AI
hApoAII / <i>mApoAII</i>	apolipoprotein AII
hApoAIV / <i>mApoAIV</i>	apolipoprotein AIV
hApoB / <i>mApoB</i>	apolipoprotein B
hApoCII/ <i>mApoCII</i>	apolipoprotein CII
hApoCIII / <i>mApoCIII</i>	apolipoprotein CIII
hApoE	apolipoprotein E
rCRBP II	cellular retinol-binding protein II
<i>mRBP</i>	<i>retinol-binding protein</i>
rFabpi	intestinal fatty acid-binding protein
hMTP	microsomal triglyceride transfer
<i>mLFABP</i>	<i>L-Type fatty acid-binding protein</i>
Transport von Gallensäuren	
<i>mNTCP</i>	<i>solute carrier family 10</i>
<i>mOATP1</i>	<i>organic anion transporter protein 1</i>
Andere Serumproteine	
hTFN / <i>mTFN</i>	transferrin
mTTR	transthyretin
SERPINA1	alpha-1-antitrypsin
hSHBG	Sex hormone-binding globulin
Metabolismus von Nährstoffen	
Metabolismus von Lipiden und Steroiden	
hMCAD	medium-chain acyl CoA
rACO	acyl-CoA oxidase
rmitHMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
rHD	acyl-CoA hydratase-dehydrogenase
rTB	3-keto acyl-CoA thiolase B
hALDH3	Aldehyde dehydrogenase 3
hALPI	intestinal alkaline phosphatase
hGK	glycerol kinase
Metabolismus von xenobiotischen Verbindungen	
mCYP2A4	cytochrome 2A4
rabCYP2C1	cytochrome 2C1
rabCYP2C2	cytochrome 2C2
rabCYP2C3	cytochrome 2C3
hCYP2C9	cytochrome 2C9
hCYP2D6	cytochrome 2D6
rCYP3A1	cytochrome 3A1
hCYP3A4	cytochrome P450 3A4
rCYP3A23	cytochrome 3A23
rCYP7A1	cytochrome 7A1
hCYP7	cytochrome 7
hDD/AKR	Dihydrodiol dehydrogenase 4
Glukose-Metabolismus	
rPEPCK / <i>mPEPCK</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase
rL-PK/ <i>mL-PK</i>	liver-type pyruvate kinase
rALDOB/ <i>mALDOB</i>	aldolase B
r-insulin	insulin
GK	glucokinase
<i>mglut2/rGlut2</i>	<i>Glucose transporter type 2</i>
<i>mGYS</i>	<i>glycogen synthase</i>
<i>mG6P</i>	<i>glucose-6-phosphatase</i>
<i>rOGDH E1</i>	<i>2-oxoglutarate dehydrogenase E1</i>
<i>UCP-2</i>	<i>mitochondrial uncoupling protein-2</i>

Aminosäuren-Metabolismus

rTAT	tyrosine amino transferase
rOTC (enh)	ornithine transcarbamylase
rOTC / mOTC	ornithine transcarbamylase
hmitALDH2	Aldehyde dehydrogenase 2
<i>mPAH</i>	<i>phenylalanine hydroxylase</i>
rArg	<i>arginase</i>

Blutkoagulation und Hämatopoese

mFactor VII	Factor VII
hFactor VII	Factor VII
hFactor VIII	Factor VIII
hFactor IX	Factor IX
hFactor X	Factor X
hEPO / <i>mEPO</i>	erythropoietin
hATIII	antithrombin
hANG	angiotensinogen

Transkriptionsfaktoren / Leberdifferenzierung

hHNF1 α / <i>mHNF1α</i>	hepatocyte nuclear factor 1 alpha
XnLFB1/HNF-1	hepatocyte nuclear factor 1 alpha
rHNF6	hepatocyte nuclear factor 6
<i>mPXR</i>	<i>pregnane-X-receptor</i>

Immunfunktion

mBf	factor B
hMSP	macrophage stimulating protein
hAMBP	alpha-1-microglobulin & bikunin

Virale Gene

hHBV enh I	hepatitis B virus enhancer I
hHBV enh II	hepatitis B virus enhancer II
hHBVnucleocapsid	hepatitis B virus nucleocapsid
wWHVEnII	woodchuck hepatitis virus enhancer II
HIV LTR	immunodeficiency virus long terminal

Wachstumsfaktore

hHGFL	hepatocyte growth factor-like protein
rPRLR	prolactin receptor
bGHR1a	growth hormone receptor 1a

Zellstruktur

hBGP	biliary glycoprotein/CEA family
hGCC	guanylyl cyclase C
<i>rCDH1 / mCDH1</i>	<i>E-cadherin</i>
<i>rZO1 / mZO-1</i>	<i>tight junction protein 1</i>
<i>mCEACAM1</i>	<i>CEA-related cell adhesion molecule 1</i>
<i>KRT</i>	<i>cytokeratin</i>

65 HNF4 α -Zielgene, die durch DNA-Bindungsstudien und Transaktivierungsexperimente identifiziert worden sind, sind aufgelistet. Kursiv sind 15 potentielle HNF4 α -Zielgene angegeben, die in der HNF4 α -defizienten Maus (Duncan et al. 1997; Li et al. 2000; Stoffel and Duncan 1997) und in der leberspezifischen Knockout-Maus

(Hayhurst et al. 2001; Parviz et al. 2003) oder durch HNF4 α Überexpression (Späth and Weiss 1998) identifiziert worden sind. Diese Gene werden durch HNF4 α reguliert, sind aber nicht als direkte Zielgene experimentell bestätigt worden. (Modifizierte Tabelle nach Sladek and Seidel 2001). Abkürzungen: h: human; m: mouse; r: rat; rab: rabbit

Zu Beginn dieser Arbeit war noch kein Gen bekannt, dessen Expression von HNF4 α in Nierenzellen gesteuert wird. Eine vor kurzem publizierte Studie identifizierte das AMBP-Gen (α -1-microglobulin/bikunin precursor) als HNF4 α -reguliertes Gen in proximalen Tubuluszellen (LLC-PK1 Zellen). Das AMBP-Protein, das in den tubulären Zellen exprimiert wird, besitzt immunsuppressive Eigenschaften, aber deren genaue Funktion in der Niere ist noch unbekannt (Grewal et al. 2005). Die Identifizierung der durch HNF4 α regulierten Gene in der Niere bleibt noch von großer Bedeutung, um die Funktion von HNF4 α in diesem Organ zu charakterisieren.

2.1 Mikroarray-Studien zur Identifizierung von HNF4 α -Zielgenen

Die Einführung der Mikroarray-Technologie hat ermöglicht, die Expression tausender Gene gleichzeitig zu messen (Lockhart et al. 1996). Durch die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms (International Human Genome Sequencing Consortium 2001) und der damit verbundenen Erkenntnis über die Anzahl und Lokalisation der meisten kodierenden Gensequenzen haben Untersuchungen, die auf der DNA-Mikroarraytechnologie beruhen, große Bedeutung erlangt. Solche Arrays mit einer großen Anzahl von Gensequenzen ermöglichen die gleichzeitige Untersuchung der Expression von sehr vielen Genen.

Zu Beginn dieser Arbeit war noch keine Mikroarray-Analyse der HNF4 α -regulierten Gene durchgeführt worden. In den letzten Jahren sind aber mehrere Studien zur Identifizierung neuer HNF4 α -regulierter Gene durch Analyse des Genexpressionsprofils mittels Mikroarray-Technologie erschienen (Naiki et al. 2002; Odom et al. 2004; Thomas et al. 2004). Diese Analysen haben über 1000 potentielle HNF4 α regulierte Gene ergeben.

In einer ersten Arbeit wurde HNF4 α in menschliche Hepatomazellen (HuH-7) mit einem adenoviralen Vektor transient eingebracht, um durch Erhöhung der endogenen Aktivität von HNF4 α Veränderungen in der Genexpression zu erfassen (Naiki et al. 2002). Aus der Analyse von 9182 Genen mit cDNA Mikroarrays wurden 56 Gene identifiziert, deren Expression mehr als zweifach durch HNF4 α stimuliert wurde, und 6 Gene, die in ihrer Aktivität reprimiert wurden.

Eine Kombination aus Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) und Promotor-Mikroarray wurde ebenfalls zur Analyse der HNF4 α -Zielgene eingesetzt. Dabei wurde ein Mikroarray

mit den Promotoren von 13.000 Genen verwendet. Es zeigte sich, dass HNF4 α zusammen mit der RNA-Polymerase II an die Promotoren von 910 Genen in Hepatozyten und 758 Genen in pankreatischen Inseln bindet (Odom et al. 2004). Die Bindung von HNF4 α zusammen mit der RNA-Polymerase II an die Promotoren dieser Gene weist auf eine direkte Regulation der Expression dieser Gene durch HNF4 α hin.

Eine Mikroarrayanalyse zur Identifizierung von HNF4 α -regulierten Genen wurde ebenfalls von Thomas et al durchgeführt. In dieser Arbeit wurde HNF4 α in pankreatischen β -Zellen (INS-1) konditional exprimiert (Thomas et al. 2004). Aus der Analyse von > 15.000 Genen wurden 338 Gene identifiziert, deren Expression mehr als 2,5-fach durch HNF4 α reguliert wurde.

Tab. I.3: Durchgeführte Mikroarray-Studien zur Identifizierung von HNF4 α -Zielgenen.

Referenz	Experimentelles Modell	Anzahl der identifizierten HNF4 α -regulierten Gene
Naiki et al 2002	humane Hepatomazellen (HuH-7)	62 Gene
Odom et al 2004	isolierte humane Hepatozyten und pankreatische Inseln	910 Gene in Hepatozyten 758 Gene in pankreatischen Inseln
Thomas et al 2004	Insulinoma Zellen (INS-1 Zellen), Ratte	338 Gene

3 Funktionsausfall des Transkriptionsfaktors HNF4 α bei Krankheiten des Menschen

HNF4 α reguliert zahlreiche Gene und ist für die Embryonalentwicklung und für die Funktion der Leber und Pankreas essentiell, daher liegt es nahe, dass eine Fehlfunktion von HNF4 α zu Erkrankungen des Menschen führen kann.

Die Regulation der Expression von mehreren Apolipoproteinen durch HNF4 α lässt eine Beteiligung von HNF4 α an der Entstehung von Arteriosklerose annehmen (Sladek and Seidel 2001).

Belegt ist eine Beteiligung von HNF4 α an bestimmten Fällen von Hämophilie B, bei denen HNF4-Bindestellen in den Promotoren der Blutgerinnungsfaktoren VII und IX mutiert sind (Carew et al. 2000;Reijnen et al. 1992;Reijnen et al. 1993).

Belegt ist außerdem die Beteiligung von HNF4 α an MODY1, eine vererbliche Form von Diabetes. Darüber hinaus spielt HNF4 α wahrscheinlich ebenfalls eine wichtige Rolle im Typ 2 Diabetes, im hepatozellulären Karzinom und im Nierenzellkarzinom. Die Rolle von HNF4 α bei diesen Krankheiten wird im Folgenden näher erklärt.

3.1 MODY1

Heterozygote Mutationen im HNF4 α -Gen des Menschen führen zu MODY1 (maturity-onset diabetes of the young 1), einer vererbten Form von Jugenddiabetes, der durch ein frühes Ausbrechen (meist vor dem 25. Lebensjahr) und durch eine gestörte glukoseinduzierte Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas charakterisiert ist (Yamagata et al. 1996). Bisher sind 16 unterschiedliche Mutationen im HNF4 α -Gen identifiziert worden, die sowohl die kodierende als auch die regulatorische Region beeinträchtigen (Ryffel 2001; Thomas et al. 2001). Ein Teil der MODY1-Mutationen blockieren die Funktion von HNF4 α teilweise vollständig, während andere nur einen eher geringen Einfluss auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors haben (Lausen et al. 2000; Ryffel 2001).

Die MODY1-Patienten, die mit einem mutierten HNF4 α -Allel geboren werden, zeigen bei der Geburt keine Defekte im Glucose-Stoffwechsel, sondern in der Regel erst im Alter von 10 bis 40 Jahren; im Alter von 55 Jahren sind dann 95% der Mutationsträger an Diabetes erkrankt (Frayling et al. 2001). Der Mechanismus, der zu dem späten Phänotyp und zur Ausprägung der Krankheit führt, ist weitgehend unverstanden.

Die heterozygoten Mutationen im HNF4 α -Gen führen offenbar bei den meisten Patienten nur zu einer Fehlfunktion in den β -Zellen des Pankreas, obwohl HNF4 α in einer Reihe anderer Zelltypen exprimiert wird. Detaillierte Untersuchungen von metabolischen Prozessen in MODY1-Patienten haben allerdings auch Veränderungen in der Konzentration der Triglyceriden und Apolipoproteinen des Serums aufgezeigt, die auf eine veränderte Genexpression in den Hepatozyten hinweisen (Lehto et al. 1999; Shih et al. 2000). Bis jetzt wurde in MODY1-Patienten keine Fehlfunktion der Nierenzellen, wo HNF4 α ebenfalls exprimiert wird, beobachtet.

3.2 Typ2 Diabetes mellitus (T2DM)

MODY1 ist eine sehr seltene Form von Typ2 Diabetes mellitus (T2DM) und zählt nur zu etwa 0,06% der Typ2 Diabetes Fälle. Der allgemeine Altersdiabetes, Typ 2 Diabetes, stellt die häufigste Form des Diabetes mellitus dar. Der Pathomechanismus für die Entstehung des Typ 2 Diabetes beruht auf einer gestörten Insulinsekretion und/oder einer Insulinresistenz. Für den Typ 2 Diabetes besteht eine genetische Disposition, aber die verantwortlichen Gene sind im Detail noch unbekannt. In der Suche nach Varianten, die zu T2DM prädisponieren, wurde zunächst eine starke Evidenz für eine Verbindung im Chromosom q20 festgestellt (Ji et al. 1997; Permutt et al. 1998). Zwei neuliche Studien fanden in der Region, die den P2- und P1-Promotor sowie die Exons 1-3 des HNF4 α -Gens enthält, mehrere SNPs (single nucleotide

polymorphisms), die mit Typ2 Diabetes assoziiert sind (Love-Gregory et al. 2004; Silander et al. 2004). Es wird folglich spekuliert, dass Varianten, die in der regulatorischen oder kodierenden Region des HNF4 α -Gens lokalisiert sind, die Prädisposition für Typ2 Diabetes erhöhen (Gupta and Kaestner 2004).

3.3 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

Anhand von Studien, die in den letzten Jahren publiziert worden sind, wird HNF4 α mit der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms (HCC) in Verbindung gebracht. Die biallelische Inaktivierung von HNF1 α wurde im hepatozellulären Karzinom identifiziert (Bluteau et al. 2002). Da HNF1 α und HNF4 α demselben Regulationsnetzwerk angehören (Ferrer 2002; Thomas et al. 2001), deutete die Inaktivierung von HNF1 α auf eine Beteiligung von HNF4 α in der Tumorgenese des HCCs hin. Während in chemisch induziertem HCC keine Abnahme von HNF4 α festgestellt wurde (Stumpf et al. 1995), berichteten Ishiyama et al, dass die Expression von HNF4 α im engen Zusammenhang mit der Differenzierung des hepatozellulären Karzinoms steht. Sie schlugen vor, dass HNF4 α zusammen mit HNF1 α nützliche Marker sein könnten, um den Grad der Differenzierung des HCCs zu bestimmen (Ishiyama et al. 2003). Weiterhin zeigte eine systematische Untersuchung der Genexpression in humanen hepatozellulären Karzinomen mittels Mikroarray-Analyse in manchen (Choi et al. 2004) aber nicht in allen HCC-Fällen (Xu et al. 2001) eine Abnahme der HNF4 α -Expression. Darüber hinaus konnte durch die Verwendung eines Mausmodells für die Progression des HCCs von einer langsam wachsenden zu einer schnell wachsenden Form nachgewiesen werden, dass HNF4 α eine wichtige Rolle in der Progression des HCCs spielt (Lazarevich et al. 2004).

3.4 Nierenzellkarzinom (NZK)

In einer frühen Studie aus unserem Labor wurde gezeigt, dass die Abundanz und die DNA-bindende Aktivität des HNF4 α -Proteins häufig im menschlichen Nierenzellkarzinom (NZK) im Vergleich zu der korrespondierenden Normalniere reduziert sind (Sel et al. 1996). Dieser Befund wurde von Lenburg et al, die das Genexpressionsprofil im Nierenzellkarzinom und im normalen Nierengewebe verglichen, bestätigt (Lenburg et al. 2003). Durch eine genomweite Mikroarray-Analyse (45.000 Sondensätze) identifizierten sie 1.234 Gene, die im klarzelligen Nierenzellkarzinom im Vergleich zu normalem Nierengewebe mehr als dreifach induziert bzw. vermindert waren. Unter diesen Genen befand sich auch das HNF4 α -Gen, das um den

Faktor 4,7-fach herunterreguliert war. Diese Daten deuten darauf hin, dass HNF4 α eine Rolle als Tumorsuppressorgen im Nierenzellkarzinom spielen könnte.

In weiteren Vorversuchen aus unserem Labor ergaben sich erste Hinweise dafür, dass HNF4 α die Proliferation von embryonalen Nierenzellen (HEK293) beeinflusst (Dissertation J.Lausen 2001; <http://miless.uni-duisburg-essen.de>). Mit Hilfe des Tamoxifen-induzierbaren FLP-Rekombinasesystems (Angrand et al. 1998) wurden HEK293-Zellklone etabliert, die HNF4 α stabil exprimierten. Die HNF4 α -Expression hemmte das Aufwachsen stabiler Zellklone. Jedoch löste die Tamoxifen-induzierbare Rekombination in nur 30-70% der Zellen eine Expression des transfizierten HNF4 α aus. Somit war durch den Einsatz dieser Zellen die genaue Analyse des Effektes von HNF4 α auf die Proliferation von Nierenzellen so wie die Identifizierung von HNF4 α -Zielgenen nicht möglich.

Das Nierenzellkarzinom (NZK) stellt etwa 3 % aller malignen Tumorerkrankungen und 85% aller malignen Nierentumoren des Menschen dar. Zytogenetisch sind Nierenzellkarzinome sehr heterogen und werden in den vier unterschiedlichen Typen klassifiziert, die in der Tabelle I.4 aufgeführt sind (Kovacs et al. 1997). Die unterschiedlichen Arten des NZKs sind durch unterschiedliche Histologien, zytogenetische Anomalien und klinische Verläufe charakterisiert. Sie sind mit Alterationen von unterschiedlichen Genen assoziiert und antworten auf unterschiedlicher Weise auf eine Therapie (Tab. I.4). Das klarzellige NZK stellt mit einem Anteil von etwa 75% den häufigsten NZK-Subtyp dar (Linehan and Zbar 2004).

Klassifikation	Inzidenz	zellulärer Ursprung	zytogenetische Anomalien	modifizierte Gene
Klarzelliges	75%	proximaler Tubulus	Chromosom 3p Deletionen	VHL
Papilläres (chromophiles)	15%	proximaler Tubulus	Trisomie der Chromosomen 3q, 7, 12, 16, 17, 20; Verlust des Y-	Met, FH
Chromophobes	5%	Sammelrohrsystem	Monosomie der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21; Hypodiploidie	BHD
Onkozytom	5%	Sammelrohrsystem	Verlust des Chromosoms 1 und Y	BHD

Tab. I.4: Zytogenetische Klassifikation des Nierenzellkarzinoms.

Durch die Erforschung der hereditären Formen des Nierenzellkarzinoms sind vier Gene identifiziert worden, die an der Tumorgenese des NZKs beteiligt sind: VHL, c-Met, FH und BHD.

Das VHL-Gen wurde durch die Untersuchung der klarzelligen Nierenzellkarzinome, die im Rahmen eines Hippel-Lindau-Syndroms (VHL) auftreten, entdeckt (Latif et al. 1993). Das VHL-Gen ist ein Tumorsuppressorgen, welches in der Entstehung und Progression des hereditären und sporadischen klarzelligen NZKs offensichtlich eine entscheidende Rolle spielt (Gnarra et al. 1994). Mutationen in dem VHL-Gen verursachen die Akkumulation des hypoxieinduzierbaren Faktors (HIF), was zu einer gesteigerten Transkription von mehreren hypoxieinduzierbaren Genen, einschließlich VEGF, EGFR, TGF α , Glut 1 und PDGF führt (Linehan and Zbar 2004).

Das c-MET-Gen und das FH- (Fumarathydratase) Gen wurden in familiären Formen des papillären Nierenzellkarzinoms identifiziert (Schmidt et al. 1997;Tomlinson et al. 2002;Toro et al. 2003). Das c-Met Gen ist ein Protoonkogen und kodiert für einen heterodimeren Transmembranrezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität, dessen Ligand der „Hepatocyte Growth Factor“ (HGF) ist (Bottaro et al. 1991). Aktivierende Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne des c-Met-Gens wurden sowohl in erblichen als auch in sporadischen Formen des papillären NZKs gefunden (Schmidt et al. 1999). Das mitochondriale Enzym Fumarathydratase katalysiert die Umwandlung von Fumarat in Malat im Citratzyklus und besitzt Charakteristika eines Tumorsuppressors (Eng et al. 2003).

Ein weiteres Gen, welches eine Rolle beim NZK spielt, ist das BHD Gen. Eine Mutation im BHD-Gen wurde bei mehr als 80% der Patienten mit Birt-Hogg-Dube Syndrom, bei denen meist das Onkozytom vorliegt, entdeckt (Nickerson et al. 2002). Die Funktion des BHD-Gens ist noch unbekannt, aber es scheint die Charakteristika eines Tumorsuppressorgens zu haben (Khoo et al. 2003).

Die in erblichen NZK identifizierten Gene haben auch in sporadischen NZK Bedeutung. Manche Studien deuten an, dass die nachgeschalteten Signalwege der verschiedenen identifizierten Gene überlappen könnten (Eng et al. 2003;Pennacchietti et al. 2003).

Mit Hilfe der Mikroarray-Technologie (Lockhart et al. 1996) sind in den letzten Jahren zahlreiche Studien durchgeführt worden, die das Genexpressionsprofil im Nierenzellkarzinom analysiert haben. Manche dieser Studien haben das Genexpressionsprofil des klarzelligen NZKs mit dem Genexpressionsprofil des normalen Nierengewebes verglichen (Boer et al. 2001;Lenburg et al. 2003;Liou et al. 2004;Takahashi et al. 2001). Andere Studien haben das Genexpressionsprofil in den vier verschiedenen NZK-Subtypen und in der normalen Niere analysiert (Gieseg et al. 2002;Higgins et al. 2004;Yao et al. 2005;Young et al. 2001). Auch Mikroarray-Analysen sind durchgeführt worden, die die Expression in verschiedenen NZK-Zelllinien untersucht haben (Ami et al. 2005;Liou et al. 2004;Struckmann et al.

2004;Takahashi et al. 2003). Aufgrund der Mikroarray-Analysen sind verschiedene Subtyp-spezifische Tumormarker und prognostische Marker der Nierenzellkarzinome identifiziert worden. Es sind ebenfalls Gene identifiziert worden, die im NZK differentiell exprimiert sind und möglicherweise eine Rolle in der Tumorgenese des NZKs spielen. Jedoch muss die klinische Relevanz der identifizierten Gene noch analysiert werden.

Da für das NZK keine Frühsymptome existieren, und die allgemeinen Tumorsymptome meist Folge einer Metastasierung sind, ist bei 20 % der Betroffenen der Tumor bereits bei der Erstdiagnose metastasiert, bei weiteren 50 % metastasiert der Tumor im weiteren Verlauf. Nur bei lokal begrenzten Tumoren ist durch deren vollständige operative Entfernung noch eine Heilung möglich. Beim Auftreten von Tumormetastasen gibt es keine effektive Therapie. Metastasierende Nierenzellkarzinome sind gegen Chemo-, Strahlen- und Hormontherapie resistent (Motzer and Russo 2000). Da es beim Nierenzellkarzinom bisher kein Tumormarker für eine frühe Diagnose sowie keine effektive Behandlung des metastasierten NZKs gibt, bleiben neue Ansätze zur Diagnostik und Therapie des Nierenzellkarzinoms dringend erforderlich.

Trotz den Forschungsfortschritten, um den molekularen Mechanismus des NZKs aufzuschließen, müssen die molekularen Signalwege, die bei der Entstehung, Progression und Metastasierung des NZKs beteiligt sind, noch identifiziert werden.

4 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen zunächst Nierenzellen generiert werden, die HNF4 α wt in einer effizienten induzierbaren Form exprimieren. Als Negativkontrolle für die Experimente sollen HNF4 α -Mutanten, die eine geringe oder keine Aktivität aufweisen, ebenfalls in die Zellen stabil transfiziert werden.

Mit Hilfe der etablierten Zellen soll anschließend untersucht werden, ob HNF4 α die Proliferation beeinflusst. Dabei soll das Proliferationsverhalten der nicht induzierten und induzierten Zellen verglichen werden. Der Nachweis einer antiproliferativen Wirkung von HNF4 α würde einen weiteren Hinweis für eine Tumorsuppressorfunktion von HNF4 α in Nierenzellen darstellen. Darüber hinaus soll dem Mechanismus für die mögliche antiproliferative Wirkung von HNF4 α nachgegangen werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung der Gene, die durch HNF4 α in Nierenzellen reguliert werden. Die modernen Entwicklungen der Mikroarray-Technologie sollen dazu genutzt werden. Dadurch sollte ein möglichst umfangreiches Expressionsprofil HNF4 α -regulierter Gene erhalten werden. Dabei können möglicherweise Gene identifiziert werden, die Regulatoren der Zellproliferation sind und damit eventuell zur Tumorsuppressorfunktion von HNF4 α beitragen. Weiterhin soll die Bedeutung ausgesuchter Kandidatengene bei der Vermittlung der möglichen proliferationshemmenden Wirkung von HNF4 α analysiert werden.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Chemikalien, Puffer und Enzyme

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in analytischer Qualität von den Firmen Aldrich (Steinheim), Amersham-Biosciences (Uppsala, Schweden), Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Gibco (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (München) bezogen. Falls nicht anders angegeben wurden die verwendeten Lösungen und Puffer nach Protokollen der Methodensammlung von Sambrook et al. (1989) hergestellt. Restriktionsenzyme und modifizierende Enzyme stammten von den Firmen Roche (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe) und Pharmacia (Freiburg). Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

1.2 Zellkultur

Zellkultur-Materialien wurden von den Firmen TPP (Trasadingen, Schweiz) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

2 Molekularbiologische Methoden

2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Techniken wie Gelelektrophoresen, Restriktionsverdauung, Ligationen, sowie die Anzucht und Transformation von Bakterien wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen (Sambrook et al. 1989) durchgeführt.

Zur Aufreinigung der DNA nach enzymatischen Reaktionen wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) verwendet. Aus Gelen wurde DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits isoliert (Qiagen). Die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA (bis 20 µg) aus Bakterienkulturen erfolgte mit einer Methode, die auf alkalischer Lyse beruht (Sambrook et al., 1989) oder mit „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen). Große Mengen Plasmid-DNA (bis 500 µg) wurden mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen) gewonnen.

Sequenzierungen wurden vom Sequenzierservice der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen (Institut für Humangenetik, Essen) durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Sequenzierprimer sind in der Tabelle II.1 aufgeführt.

Tab. II.1: Verwendete Oligonukleotide für Sequenzierung.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Plasmid / Gen
PCDNA5/FRT/TO SEQ	GCT CGT TTA GTG AAC CGT CAG	pCDNA5/FRT/TO
BGH REVERSE PRIMER	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	pCDNA5/FRT/TO
HNF4ALFA-MYC SEQ KPN1	CTG GTA CCA TGC GAC TCT CCA	HNF4 α -myc
HNF4ALFA-MYC SEQ.R1135	TCA TTG TCA TCG ATD TGD AGC TCC	HNF4 α -myc

2.2 Plasmide

pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen): Alle cDNA-Konstrukte, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden in dieses Plasmid kloniert. Da das Plasmid eine FRT-Sequenz (Flp-Rekombinase Erkennungssequenz) enthält, kann es durch homologe Rekombination ins Genom der Flp-In T-REx 293 Zelllinie (Invitrogen), die ebenfalls eine FRT-Sequenz enthält, integriert werden.

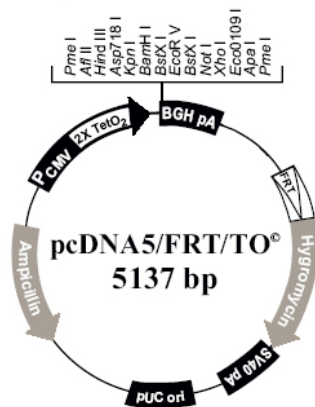


Abb. II.1: Karte des eukaryotischen Expressionsvektors **pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen)**. BGH pA: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons; FRT: „Flp Recombination Target“, Flp-Rekombinase Erkennungssequenz; Hygromycin: Hygromycin-Resistenzgen; SV40 pA: SV40 Polyadenylierungssignal; pUC ori: ColE1-Replikationsursprung; Ampicillin: Ampicillin-Resistenzgen; P_{CMV}: Promotor des humanen Cytomegalovirus; 2*TetO₂: zwei Tet-Operator Sequenzen

pcDNA5/FRT/TO HNF4 α 2: Die humane mycHNF4 α 2 Sequenz wurde mit *NotI* aus dem Expressionsvektor pOPI3-mycHNF4 α 2 (Lausen et al. 2000) geschnitten und in das *NotI* geschnittene Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO HNF4 α 2 C106R: Die C106R Mutation wurde mit Hilfe des „QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene in den pcDNA5/FRT/TO HNF4 α 2 Vektor eingeführt. Dabei wurden die vom Hersteller beschriebenen Bedingungen eingehalten. Das für die Mutagenesereaktion verwendete Primerpaar ist in Tabelle II.2 angegeben. Die Mutation wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Tab. II.2: Verwendete Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutation (QuickChange).

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Quickchange HNF4A C106R FOR	CCA GTC CCG CTA CCG CAG GCT CAA G
Quickchange HNF4A C106R REV	CTT GAG CCT GCG GTA GCG GCA CTG G

pcDNA5/FRT/TO HNF4 α 2 R154X: Die humane mycHNF4 α 2 R154X Sequenz wurde als *NotI*-Fragment aus dem Expressionsvektor pOPI3-mycHNF4 α 2 R154X (Lausen et al. 2000) in das Plasmid pcDNA5/FRT/TO (Invitrogen) kloniert.

pcDNA5/FRT/TO GFP: GFP wurde als *HindIII/XhoI*-Fragment aus pCSGFP2 (Lausen et al. 2000) herausgeschnitten und in das *HindIII/XhoI* verdaute pcDNA5/FRT/TO eingeführt.

pcDNA5/FRT/TO WT1: Die humanen WT1c und WT1d Sequenzen wurden als *XbaI*-Fragment von CMV WT1 (-/+) und CMV WT1 (+/+) (von V. Schumacher zur Verfügung gestellt) jeweils gespalten und in pBluescript II SK+ (Stratagene) kloniert. Die *KpnI/NotI*-Fragmente wurden dann in den pcDNA5/FRT/TO Vektor eingeführt.

pcDNA5/FRT/TO DSC2: Humanes DSC2 wurde als *KpnI/BamHI*-Fragment von pKS-DSC2myc (von K.J. Green zur Verfügung gestellt) (Kowalczyk et al. 1994) geschnitten und in *KpnI/BamHI* geschnittenes pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO MTM1: Humanes MTM1 wurde mit *BamHI* aus dem pCS2-hMTM1 Vektor (von J. Laporte zur Verfügung gestellt) (Blondeau et al. 2000) gespalten und in die *BamHI* Restriktionsstelle von pcDNA5/FRT/TO kloniert.

pcDNA5/FRT/TO SEPP1: Humanes SEPP1 wurde als *BamHI/XhoI*-Fragment von pBluescriptSK-hSEPP1 (von K.E. Hill zur Verfügung gestellt) (Hill et al. 1993) geschnitten und in *BamHI/XhoI* geschnittenes pcDNA5/FRT/TO kloniert.

Zur Expression der Leuchtkäfer(„firefly“)-Luziferase wurden zwei verschiedene Plasmide eingesetzt: pGL3-Control (Promega) und CMV-Luc (von W. Schulz zur Verfügung gestellt). Das Plasmid pCSFlpe1 (Werdien et al. 2001) wurde zur Expression der Flp-Rekombinase verwendet.

3 Proteinchemische Methoden

3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen

Zur Gewinnung von Proteinlysaten wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst, in ein 15 ml Röhrchen überführt und zentrifugiert (900 rpm, 5 min, RT). Die Pellets wurden dann mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 1min, 4°C) wurden die Zellen in eiskaltem RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Natriumdeoxycholat, 1% Triton X-100) mit Protease-Inhibitoren (protease inhibitor cocktail P-8340, Sigma, 1:500) resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (50.000 rpm, 10 min, 2°C) abgetrennt, und das Lysat in ein frisches 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration von Proteinen in einer Lösung wurde mit der Bradford-Methode (Bradford 1976) ermittelt. Dazu wurde das Bio-Rad Protein-Assay Reagenz (Bio-Rad) verwendet. Eine Eichgerade mit verschiedenen Mengen an Rinderserumalbumin (BSA) (2 bis 20 µg) wurde erstellt. 2-10 µl Proteinlösung wurden in 1600 µl H₂O in Plastik-Küvetten verdünnt und mit 400 µl Bio-Rad Protein-Assay-Reagenz gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm mit dem Spectrophotometer (S2000, WPA) gemessen. Mit Hilfe der Eichgerade wurde die Konzentration der Proteinlösung ermittelt. Als Kontrolle wurde der RIPA-Puffer, in dem die Proteine gelöst waren, verwendet.

3.3 SDS-Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen nach ihrer Größe wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese in einem von Laemmli etablierten SDS-haltigen, Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem verwendet (Laemmli, 1970). Dafür wurde eine vertikale Gelelektrophorese-Apparatur (Mini-Protean 3 System von Bio-Rad) eingesetzt. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden 7,5 oder 10 %ige Trenngele verwendet. Die darauf geschichteten Sammelgele wiesen eine Polyacrylamidkonzentration von 5 % auf. Als Standard diente „Precision Plus Protein Standards, Dual Color“ (Bio-Rad). Die Proben für die SDS-Gelelektrophorese wurden mit einem 2× Laemmli-Puffer (100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 4% SDS, 20% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau, 10% β-Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden sie bei konstanter Spannung getrennt.

3.4 Western Blot

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt worden waren, wurden nach der „semi dry“-Methode elektrophoretisch auf Nitrozellulosemembranen (Protran, Schleicher&Schuell) übertragen. Hierfür wurden Membran und Gel zwischen mehrere mit Transfer-Puffer getränkte Filterpapiere (Whatman) gelegt und zwischen zwei Flächenelektroden eingespannt

(Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad). Der Transfer erfolgte 1 Stunde bei 2 mA/cm². Nach dem Proteintransfer wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit Liquid Block (Amersham, 1:20 in Blockierungspuffer) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden spezifischen primären Antikörper. Zur Detektion des primären Antikörpers dienten Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper (s. Tab. II.3). Nach jeder Antikörper-Inkubation erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS-T (1× kurz, 3× 5 min, 1× 15min, Raumtemperatur). Zur Detektion der Peroxidase-Aktivität wurde das ECL-Kit der Firma Amersham Bioscience nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Biosciences).

Tab. II.3: Verwendete Antikörper und Bedingungen für Western Blot.

	1. Antikörper	2. Antikörper
myc-tag	9E10 monoklonal, laboreigen (1:5 in PBS-T, 90 min, RT)	Anti-Maus-HRPO, NXA 931 (Amersham) (1:5000 in PBS-T, 60 min, RT)
HNF4α	HNF-4α, C-19 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000 in PBS-T, 60 min, RT)	Anti-Ziege-HRPO, A9452 (Sigma) (1:50.000 in PBS-T, 60 min, RT)
WT1	WT, C-19 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000 in PBS-T, 60 min, RT)	Anti-Kaninchen-HRPO (Jackson ImmunoResearch) (1:5000 in PBS-T, 60 min, RT)
Villin	Villin, 610358 (BD Transduction Laboratories) (1:1000 in PBS-T, 60 min, RT)	Anti-Maus-HRPO, NXA 931 (Amersham) (1:5000 in PBS-T, 60 min, RT)
MTM1	Myotubularin, C-18 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000 in PBS-T, 60 min, RT)	Anti-Ziege-HRPO, A9452 (Sigma) (1:50.000 in PBS-T, 60 min, RT)

PBS-T: PBS + 0,1% Tween20
 Transferpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% Methanol
 Blockierungspuffer: 150 mM NaCl, 100 mM Tris pH 7,5

4 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit eukaryonten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar Flow Arbeitsbank durchgeführt.

4.1 Auftauen von Zellen

Zur Rekultivierung von Zelllinien, die in Kryoröhrchen als Suspension mit 10% DMSO (v/v) in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden, wurden sie in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut. Dann wurden die Zellen in ein 15 ml Röhrchen gegeben und mit 10 ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in frischem Medium resuspendiert und ausgesät. Einen Tag später wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Rückstände zu entfernen.

4.2 Kulturbedingungen

Die Ausgangszelllinie Flp-In T-REx 293 (Invitrogen) und die damit hergestellten stabilen Zelllinien wurden dem Invitrogen-Handbuch „Growth and Maintenance of Flp-In T-REx Cell Lines“ folgend kultiviert. In der Tabelle II.4 sind die verwendeten Medien aufgeführt.

Die Zellen wurden bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 7,5% bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

Tab. II. 4: Kulturmedien für die verwendeten Zelllinien.

Flp-In T-REx 293 Zelllinie Medium+Blasticidin+Zeocin	Flp-In T-REx 293 + cDNA-Konstrukt Zelllinien Medium+Blasticidin+Hygromycin
DMEM mit 4,5 g/l Glucose	DMEM mit 4,5 g/l Glucose
10% FCS	10% FCS
1% Penicillin /Streptomycin (10.000 U/ml)	1% Penicillin /Streptomycin (10.000 U/ml)
1% L-Glutamin (200 mM)	1% L-Glutamin (200 mM)
15 µg/ml Blasticidin	15 µg/ml Blasticidin
100 µg/ml Zeocin	50 µg/ml Hygromycin B

4.3 Subkultivierung von Zellen

Die Zellen wurden jeweils bei annäherndem Erreichen der Konfluenz in eine neue Schale umgesetzt. Konfluenz war nach Aussaat von ca. 1×10^6 Zellen in eine 10cmØ-Schale mit 10 ml Kulturmedium nach 3-4 Tagen erreicht. Das Subkultivierung verlief wie folgt: Nach Absaugen des Mediums aus der Schale wurde mit PBS gespült und eine Lösung aus Trypsin-Versen wurde zugegeben. Die Abrundung und Ablösung der Zellen war nach 3 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C abgeschlossen. Daraufhin wurde die Trypsinaktivität mit Kulturmedium gestoppt. Je nach Bedarf wurden die Zellen verdünnt und in neue Kulturgefäße überführt.

4.4 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Vor dem Zählen wurden die Zellen mit einer Trypsin-Versen-Lösung von der Gefäßoberfläche abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Nach dem Auszählen der Zellen in jedem der vier Eckquadrate und Mitteln dieser Zahlen sowie anschließender Multiplikation mit dem Faktor 1×10^4 wurde die Zellzahl pro ml Zellsuspension erhalten.

4.5 Kryokonservierung

Zur Erhaltung der Zelllinien wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden 10^7 Zellen in 3 ml kaltem Einfriermedium (Kulturmedium ohne Antibiotika + 10% FCS + 10% DMSO) aufgenommen, und in 1 ml Aliquoten in Kryoröhrchen (1,8 ml) überführt. Die

Kryoröhrchen wurden zunächst in einer Styroporbox auf -80°C heruntergekühlt. Nach 24-48 Stunden wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196°C) umgelagert.

5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie wurde verwendet, um das Vorhandensein oder die Lokalisation von Proteinen in Zellen zu untersuchen. Dafür wurden die Zellen auf 6-well Platten verteilt, in die zuvor sterile Glasplättchen eingebracht wurden. 1×10^5 bis 3×10^5 Zellen wurden pro Vertiefung ausgesät. Die Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen, mit Methanol oder Paraformaldehyd (4%) fixiert und danach erneut zweimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation mit PBS/10% Ziegen Serum für 1 Stunde bei 4°C gesättigt. Die Zellen wurden dann mit dem Erst- und Zweitantikörper inkubiert (s. Tab. II.5). Die Inkubation mit dem Cy3-markierten Zweitantikörper erfolgte im Dunkeln. Nach jede Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen ($1 \times$ kurz, 1×10 min). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Glasplättchen mit einer Pinzette aus den Vertiefungen entnommen und mit einem Tropfen „Mounting-Medium“ (Vectashield, Vector-Laboratories) auf einen Objektträger gebracht. Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (DM IRE2, Leica) analysiert. Die Dokumentation erfolgte mittels einer am Mikroskop installierten Digitalkamera (DC 500, Leica) und dem Bildbearbeitungssystem QFluoro.

Tab. II.5: In der Immunfluoreszenz eingesetzte Antikörper.

	Fixierung	1. Antikörper	2. Antikörper
myc-tag	Methanol	9E10 monoklonal, laboreigen (1:4 in DMEM, 60 min, RT)	Anti-Maus-Cy3 (Jackson ImmunoResearch) (1:200 in PBS/10% Ziegen Serum, 60 min, 4°C)
WT1	Methanol	WT, C-19 (Santa Cruz Biotechnology) (1:1000 in PBS, 60 min, RT)	Anti-Kaninchen-Cy3 (Jackson ImmunoResearch) (1:200 in PBS/10% Ziegen Serum, 60 min, 4°C)

5.1 Methanol-Fixierung

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit eiskalter Lösung von Methanol für 10 min fixiert. Anschließend wurde das Methanol abgenommen, und die Präparate wurden 10 min an der Luft getrocknet. Die fixierten Zellen wurden dann entweder bei -20°C eingefroren oder in der Immunfluoreszenz sofort untersucht.

5.2 Kernfärbung mit Hoechst A 33342

Das DNA-spezifische Fluorochrome Hoechst A 33342 (Benzimid, 2'-[4-Hydroxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole, Sigma) wurde zur Kernfärbung eingesetzt.

Dazu wurden die Zellen für 5 min mit Hoechst 33342 (1:1000 in H₂O) bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mit Vectashield eingedeckt.

5.3 Färbung von Aktinfilamenten mit FITC-Phalloidin

Zur Färbung von Aktinfilamenten wurde FITC-gekoppeltes Phalloidin, welches spezifisch an filamentöses Aktin bindet, verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS⁺⁺ (PBS + 1 mM MgCl₂ + 2,5 mM CaCl₂) gewaschen und mit 4% Formaldehyd für 10 min fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen für 10 min mit FITC-Phalloidin (Sigma) (1:100 in PHEM-Puffer + 0,1% Triton X-100) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit PBS⁺⁺ gewaschen und mit Hoechst –wie unter II. 5.2 beschrieben- gefärbt.

5.4 GFP-Detektion

Zur Detektion der Fluoreszenz von GFP in lebenden Zellen, wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen. Dann wurden die Glasplättchen, auf denen die Zellen gewachsen waren, mit einem Tropfen PBS auf einen Objektträger gebracht. Da das GFP-Signal sehr rasch ausbleicht, wurde die Fluoreszenz schnell unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt und dokumentiert.

6 Herstellung stabiler induzierbarer Zelllinien mit dem Flp-In T-REx System

6.1 Flp-In T-REx 293 Zellen

Zur Etablierung von HEK293 Zellen, die verschiedene Konstrukte konditional exprimieren, wurde die Flp-In T-REx 293 Zelllinie (Invitrogen) eingesetzt. In dieser Zelllinie sind eine Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase (FRT-Sequenz) und ein Expressionsplasmid für den Tet-Repressor stabil in die genomische Sequenz integriert (s. Abb. III.1).

6.2 Klonierung des gewünschten Transgens in den pcDNA5/FRT/TO-Vektor

Die cDNA-Konstrukte, die stabil in die Zelllinie eingebracht werden sollten, wurden zunächst - wie unter II. 2.2 beschrieben- in den pcDNA5/FRT/TO-Vektor kloniert.

6.3 Kotransfektion des pcDNA5/FRT/TO-Vektors und der Flp-Rekombinase mit Lipofectamine

Zur Integration des pcDNA5/FRT/TO-Plasmids in die Flp-In T-REx 293 Zellen durch Flp-vermittelte Rekombination wurden die Zellen mit dem pcDNA5/FRT/TO-Plasmid zusammen mit dem Flp-Rekombinase Expressionsvektor pCSFLPe1 (Werdien et al. 2001) im Verhältnis 1:1 kotransfiziert. Für die Transfektion wurden am ersten Tag 3×10^5 Zellen auf 6-well Platten ausplattiert. Am zweiten Tag erfolgte die Transfektion. Insgesamt wurden 1,6 µg Plasmid-DNA pro well transfiziert. In 4,5 ml Reaktionsgefäße mit rundem Boden wurden 100 µl Lipofectamine (Invitrogen) (1:17,5 in serumfreien Optimum-Medium (Invitrogen) verdünnt) vorgelegt. Dazu wurden 100 µl in Optimum verdünnte DNA tropfenweise dazugegeben, das Gemisch geschüttelt und 15 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Zellkulturmedium durch 1,5 ml serumfreies Optimum-Medium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Lipofectamine-DNA-Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit frischem Medium (Medium + Blasticidin, ohne Zeocin) versetzt.

6.4 Selektion mit Hygromycin

Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen tryptiniert und auf 10cmØ-Schalen verdünnt. 24 Stunden danach wurden die Zellen mit Hygromycin haltigem Medium (50 µg/ml Hygromycin) (Medium + Blasticidin + Hygromycin, s. Tab. II.4) selektiert. Die Selektion dauerte 10-14 Tage. Nach dieser Zeit waren nur resistente Zellkolonien in den Schalen vorhanden. Die Kolonien wurden tryptiniert, vereinigt und expandiert. Sobald möglich wurden Aliquots von den entstandenen polyklonalen Zelllinien eingefroren.

6.5 Analyse der hergestellten Zelllinien

Die Zellpopulationen wurden weiter expandiert und dann mit geeigneten Mitteln (Immunfluoreszenz, Western Blot, β-Galaktosidase-Test) auf die stabile Integration der Konstrukte überprüft.

6.5.1 β-Galaktosidase-Test

In dem β-Galaktosidase-Test wird die Aktivität des Expressionsproduktes des *lacZ*-Reportergens, der β-Galaktosidase gemessen. Die Messung beruht auf der Fähigkeit des Enzyms das Substrat X-Gal innerhalb der Zelle in ein wasserunlösliches, blau gefärbtes Produkt umzuwandeln. Zum Nachweis der Aktivität der β-Galaktosidase wurden gegen

Hygromycin resistente Zelllinien, die in 6-well-Platten ausgesät worden waren, zunächst einmal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS mit 1% Formaldehyd und 0,2% Glutaraldehyd fixiert. Danach wurden die Zellen erneut einmal mit PBS gewaschen und 1-2 Stunden in PBS mit 5 mM Kaliumferricyanid, 5 mM Kaliumferrocyanid, 2 μ M MgCl_2 und 1 mg/ml X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen im Lichtmikroskop auf ihre β -Gal-Expression untersucht. Die Anzahl der blau gefärbten Zellen wurde in zufällig ausgewählten Feldern ausgezählt.

6.6 Induktion mit Tetracyclin

Für die Induktion der Expression der stabil eingeführten Gene wurden die Zellen, wenn nicht anders beschrieben, in Medium mit Tetracyclin (1 μ g/ml) kultiviert. Da Ethanol als Lösungsmittel für Tetracyclin dient, wurden die Kontrollzellen statt mit Tetracyclin mit der gleichen Menge an Ethanol behandelt. In allen Experimenten wurden die Zellen 24 Stunden vor Tetracyclin Induktion ausgesät. Da Tetracyclin eine Halbwertszeit von 24 Stunden hat, wurde es jeden zweiten Tag zu dem Medium gegeben.

7 Zellassays

7.1 Untersuchung der Morphologie

Im Verlauf der Kultur erfolgte täglich eine Kontrolle der Zellmorphologie im Phasenkontrastmikroskop (Diavert, Leitz). Phänotypische Veränderungen der Zellen wurden mit digitaler Fotografie dokumentiert (Nikon Coolpix 4500).

7.2 Untersuchung der Zellproliferation

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden in dieser Arbeit drei unterschiedliche Methoden verwendet.

7.2.1 Zellzahlbestimmung

Zur Untersuchung der Wachstumskinetik wurden 2×10^4 Zellen / well in 12-well-Platten ausgesät. 24 Stunden danach wurden die Zellen mit Tetracyclin induziert (+Tet) oder unbehandelt gelassen (-Tet). Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten trypsiniert und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt (s. II 4.4). Bei jeder Messung wurden zwei unabhängige wells ausgewertet.

7.2.2 MTS-Test

Viele die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuche erfolgten mit Hilfe des MTS-Tests („CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“, Promega). Das Prinzip des MTS-Tests beruht auf der Messung der metabolischen Aktivität der Zellen. Das Tetrazoliumsalz MTS wird in lebenden Zellen durch das Reduktionsäquivalent $\text{NADH} + \text{H}^+$ unter Anwesenheit des Elektronenüberträgers Phenazinethosulfat (PES) zu einem Formazansalz umgewandelt (s. Abb. II.2). Die Absorption des Formazans kann bei 490 nm gemessen werden und ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur.

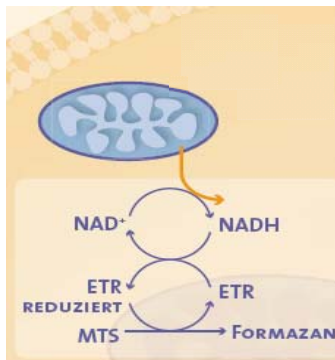


Abb. II.2: Bestimmung der Zellzahl durch Messung der metabolischen Aktivität der Zellen (MTS-Test). Dieser Test misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen, die das Substrat MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)2H tetrazoliumsalz) mit Hilfe des Elektronenüberträgers PES (Phenazinethosulfat) zu Formazan umwandeln. ETR: Electron Transfer Reagent = Elektronenüberträger, NADH:Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrogen = Reduktionsäquivalent. Quelle der Abbildung: http://www.promega.com/de/Literatur/Proliferationsassays_RZ.pdf

Die Zellen wurden mit Multipipetten auf 96-well-Platten in einer Dichte von $2 \cdot 10^3$ Zellen in 100 µl Medium pro well ausgesät und nach 24 Std. mit Tetracyclin induziert oder unbehandelt gelassen. Nach Ende der Inkubationsdauer wurde in jedes well 20 µl MTS-Lösung mit der Multipipette zugegeben. Nach 45 oder 60 min Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde die Absorption bei 490 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Model 550, Bio-Rad) gemessen. Zur Festlegung des Hintergrunds dienten die Messwerte aus wells, in denen nur Medium vorhanden war. Jedes Experiment wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt.

7.2.3 BrdU-Assay

Der BrdU-Assay misst die DNA-Synthese als direkteren Ausdruck der proliferativen Aktivität, da ein wesentlicher Schritt in der Zellteilung die Verdopplung des Chromosomensatzes in der S-Phase der Mitose ist. Dem Nährmedium wird das Nukleosid BrdU zugegeben, welches dann als Analogon in Konkurrenz zum intrazellulär synthetisierten Thymidin während der Replikation in die DNA eingebaut wird. Das in die DNA aufgenommene BrdU wird nach Fixierung der Zellen mit einem anti-BrdU-Antikörper detektiert.

BrdU-ELISA

Die Proliferation wurde mit dem Kit „Cell-Proliferation-ELISA BrdU (colorimetric)“ (Roche) untersucht. In diesem Kit ist der Anti-BrdU-Antikörper mit einer Peroxidase konjugiert, welche nach Zugabe einer Substratlösung eine Farbreaktion katalysiert. Die entstehenden Farbstoffe und damit die Absorption, sind proportional zur Zahl der proliferierenden Zellen in der jeweiligen Kultur.

Die Zellen wurden in 96-well-Platten ausgesät. Zur Synchronisierung der Zellen wurden diese 24 Std. nach Aussaat in Medium mit 0,2% FCS für zwei Tage kultiviert. Dann wurde das Medium durch 10% FCS-Medium ersetzt, und die Zellen wurden mit Tetracyclin induziert oder unbehandelt gelassen. Nach unterschiedlichen Induktionszeiten wurde der BrdU-ELISA-Test nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Zellen für 1 Std. mit 10 μ M BrdU inkubiert. Die Detektion der Immunkomplexe durch Zugabe der Substratlösung wurde nach 5 min mit 25 μ l 1M H_2SO_4 gestoppt und unmittelbar anschließend in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Model 550, Bio-Rad) bei 450 nm gemessen. Um die Signale auf die Anzahl der Zellen zu korrigieren, wurde in parallelen Platten die Zellzahl mit dem MTS-Test (s. II.7.2.2) ermittelt.

BrdU-Einbau-Analyse mit FACS

Durch FACS-Analyse mit einem Anti-BrdU-FITC gekoppelten Antikörper lässt sich der Anteil an Zellen, welche die S-Phase erreicht haben, bestimmen. Für die FACS-Analyse wurde das In Situ Cell Proliferation Kit, FLUOS (Roche) eingesetzt. Dabei wurden die zu analysierenden Zellen für einen Zeitraum von 1 Std. mit BrdU inkubiert. Die Messung erfolgte an einem FACSVantage Durchflusszytometer (Becton Dickinson). Die Messdaten wurden mit der Software Cellquest-Software (Becton Dickinson) ausgewertet.

BrdU-Einbau-Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie

Für die BrdU-Einbau-Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde das In Situ Cell Proliferation Kit, FLUOS (Roche) eingesetzt. Der durchschnittliche prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl wurde bestimmt. Pro Ansatz wurden 1500 Zellen gezählt.

7.2.4 Zellzyklus-Analyse durch PI-Färbung

Der Zellzyklus kann durch Anfärbung der nukleären DNA mit Propidiumiodid (PI) analysiert werden. Der DNA-Gehalt der Zellkerne verdoppelt sich während eines Zellzyklus, so dass je

nach DNA-Gehalt eine Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Zellzyklusphase möglich ist. Dabei enthalten Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus weniger DNA als solche in der S-Phase, und diese wiederum weniger DNA als G2/M-Phase-Zellen.

Die Zellen (in 6cmØ-Zellkulturschalen) wurden mit Trypsin abgelöst und zusammen mit dem Zellkulturüberstand abzentrifugiert (10 min, 4°C, 1200 rpm). Anschließend wurde das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation jeweils: siehe oben) und dann in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Nun wurden die Zellen unter Vortexen mit 10 ml eiskaltem 70%-igen Ethanol fixiert und 24 Std. bis 4 Wochen bei -20°C gelagert.

Die fixierten Zellen wurden zentrifugiert (10 min, 4°C, 2000 rpm), das Ethanol sorgfältig abgenommen und das Pellet zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen (Zentrifugation jeweils: 10 min, 4°C, 1600 rpm). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PI-Färbelösung (100 µg/ml Propidiumiodid, 100 µg/ml RNase A in PBS) für mindestens 30 min (dunkel, 4°C) inkubiert. Die Detektion der Fluoreszenz und Datenaquisition erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACSVantage und der CellQuest Software (Becton Dickinson). Pro Messung wurde 10.000 Zellen erfasst. Die Verteilung der Zellen aufgrund ihres DNA-Gehaltes wurde als Histogramm dargestellt.

7.3 Untersuchung der Apoptose

7.3.1 Caspase 3/7 -Test

Die Aktivität der Caspase-3 und -7 wurde mit dem Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) bestimmt. Das Prinzip des Tests beruht auf der Messung der Fluoreszenzzunahme, die zustande kommt, wenn das künstliche Substrat für die Caspasen-3 und -7 (Z-DEVD-Aminoluziferin), gespalten wird. Das bei der hydrolytischen Spaltung freiwerdende Aminoluziferin dient als Substrat für die „Ultra Glow-Luziferase“, welche eine Luziferasereaktion mit verlängerter Halbwertszeit katalysiert (Glow-Type Luziferasereaktion).

Die Zellen wurden mit einer Multipipette auf weißen 96-well-Platten in 100 µl Medium ausgesät und nach 24 Std. mit Tetracyclin induziert oder unbehandelt gelassen. Nach Ende der Inkubationsdauer wurden 50 µl Medium entfernt und 50 µl Caspase-Glo 3/7 Reagenz auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden unter Schütteln lysiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Luminiszenzsignal wurde eine Stunde nach Substratzugabe in einem Luminometer (Genios, Tecan) gemessen. Um die Signale auf die Anzahl der Zellen zu korrigieren, wurde in parallelen Platten die Zellzahl mit dem MTS-Test (s. II.7.2.2) ermittelt.

7.3.2 Untersuchung der Zellkernmorphologie

Um die Morphologie der Zellkerne zu untersuchen, wurden die Zellen - wie unter 5.2 beschrieben - mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (Sigma) angefärbt und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop (DM IRE2, Leica) betrachtet. Zellkerne wurden nach den morphologisch-apoptotischen Kriterien Kernpyknose (Schrumpfung des Kerns) und Kernfragmentierung analysiert.

7.3.3 Apoptose-Analyse durch PI-Färbung

Die PI-Färbung und FACS-Analyse wurde wie bei II. 7.2.4 beschrieben durchgeführt. Die Apoptose Quantifizierung erfolgte durch Messung des Anteils der Zellen mit sub-G1 DNA-Gehalt.

7.3.4 Annexin-Test

Der Annexin V-Test beruht auf der Beobachtung, dass rasch nach der Apoptoseinduktion Phosphatidylserin von der Innenseite der Plasmamembran auf die Zelloberfläche transloziert wird (Martin et al. 1995). Exponiert an der Oberfläche der apoptotischen Zelle, kann Phosphatidylserin mit Annexin V markiert werden, einem kalziumabhängigen, phospholipidbindenden Protein. Der Annexin-Test wurde mit dem Kit TACS Annexin V-FITC (Trevigen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

7.3.5 Trypanblau-Färbung

Eine weitere Methode zur Überprüfung des Zustands von Zellen ist die Anfärbung mit Trypanblau. Lebende Zellen haben die Fähigkeit diesen Farbstoff abzuwehren und nicht in ihr Zytoplasma eindringen zu lassen. Wenn Zellen nach der Farbstoffzugabe mikroskopisch bläulich angefärbt erscheinen, spricht dies für eine Schädigung bzw. Zelluntergang durch toxische oder auch apoptotische Prozesse. Für die Trypanblaufärbung wurden die Zellen 1:1 mit einer Trypanblaulösung (0,2%) verdünnt und angefärbte Zellen sofort unter dem Mikroskop mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

8 Mikroarray

Die DNA-Mikroarray-Analyse wurde in Kooperation mit PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß durchgeführt.

8.1 RNA-Isolierung für Mikroarray

Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen in 10cmØ-Schalen kultiviert. Die RNA wurde zuerst mit peqGOLD RNAPure (peqlab) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dabei erfolgte die Lyse der Zellen mit 3 ml peqGOLD RNAPure pro Schale. Abschließend wurde die RNA in 30 µl DEPC-H₂O aufgenommen, und die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die RNA wurde dann mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) ein zweites Mal aufgereinigt (max. 100 µg pro Säule). Ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) wurde durchgeführt. Nach der Reinigung wurde die Konzentration erneut photometrisch bestimmt. Danach wurde die RNA mit Ethanol und 3 M NaAc (10% des Gesamtvolumens) bei -20°C für eine Stunde gefällt. Nach Zentrifugation (40 min, 13.000 rpm, 4°C) wurde das RNA-Pellet zweimal mit 75% Ethanol gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 13.000 rpm, 4°C). Dann wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in RNase-freies Wasser in einer Konzentration von 2,5 µg/µl aufgenommen. Abschließend wurde nach erneuter Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des UV-Spektrophotometers die Konzentration der isolierten RNA durch Verdünnung auf 1,5 µg/µl eingestellt. Bis zur Mikroarray-Analyse wurde die RNA bei – 80°C gelagert.

8.2 Verwendete Chips

Die Mikroarray-Vorversuche wurden mit dem Affymetrix-Genechip HG-U95A, der 12.625 Proben beinhaltet, durchgeführt. Bei den Hauptversuchen wurde das Affymetrix Genechip Human Genome HG-U133A des Genechip Human Genome U133 Sets (A und B) eingesetzt. Im Folgenden wird die Durchführung der Mikroarray-Analyse mit dem HG-U133A Genechip beschrieben.

Bei dem Affymetrix Genechip HG-U133A handelt es sich um ein high-density Oligonukleotid-Mikroarray (synonym werden die Ausdrücke Genechip oder Mikroarray verwendet). Er detektiert mit seinen 22.283 Sondensätzen (probe sets) ca. 18.400 Transkripte (14.500 gut charakterisierte Gene). Bei diesem Genechip werden die Sonden direkt an der Glasoberfläche (Glas-Wafer, Festphase) durch eine kombinierte Methode aus Nukleotidsynthese und Photolithographie synthetisiert. Für jede Gensequenz befindet sich auf dem Array ein Sondensatz (probe set). Ein Sondensatz besteht aus 16 verschiedenen Oligonukleotid-Probenpaaren, die wiederum aus einer „Perfect Match“ (PM)- und einer „Mismatch“ (MM)-Probenzelle bestehen. Jede Probenzelle (24 × 24 µm) enthält ca. 10⁷ Kopien einer DNA-Oligonukleotid-Probe (25mer). Das „Perfect Match“ (PM)-Oligonukleotid ist 100%ig komplementär zu der Sequenz des Gens, das durch den Sondensatz repräsentiert wird. Das „Mismatch“ (MM)-Oligonukleotid enthält eine Punktmutation in der Mitte der

Sequenz, was die Bindung des entsprechenden Transkripts beeinträchtigt. Dies ermöglicht die Bestimmung des Hintergrunds und der nicht spezifischen Hybridisierung sowie die Korrektur der für die „Perfect Match“-Oligonukleotide gemessenen Signale. Bei der Auswertung der Hybridisierungsdaten wird für ein Probenpaar die Intensität der MM-Probe von dieser der PM-Probe subtrahiert.

8.3 Synthese der cDNA, Markierung und Hybridisierung

Die in der totalen RNA enthaltenen protein-kodierenden mRNAs (ca. 0.2-0.4%) wurden mit Hilfe eines T7-d(T)21 Primers und des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) zunächst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Danach wurde der komplementäre cDNA-Strang durch DNA-Polymerase I, DNA-Ligase und RNaseH synthetisiert. Die Einführung der T7-Promotorsequenz erlaubt es, in einer sogenannten in vitro Transkriptionsreaktion mit Hilfe von T7-RNA-Polymerase die Umschreibung der cDNA in biotinylierte Antisense-cRNA, die partiell komplementär zu den auf dem Chip enthaltenen PM-Oligonukleotiden ist. Da jedes cDNA-Molekül viele Male abgeschrieben wird (lineare Amplifizierung), erreicht man erst durch diesen Schritt genügend Material für eine Mikroarray-Hybridisierung (ca. 10 µg cRNA). Die biotin-markierten cRNA (Target) wurden nach Fragmentierung auf den Array hybridisiert. Nach dem Auswaschen nicht-komplementärer cRNA wurden die gebundenen komplementären cRNAs durch Bindung von Streptavidin gekoppeltem Phycoerythrin gefärbt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff wurde dann durch Aktivierung mit Laserlicht in einem speziellen GeneArray scanner (2500, Agilent) gemessen und quantifiziert. Alle Schritte wurden nach den Angaben im Affymetrix Gene Expression Analysis Technical Manual durchgeführt.

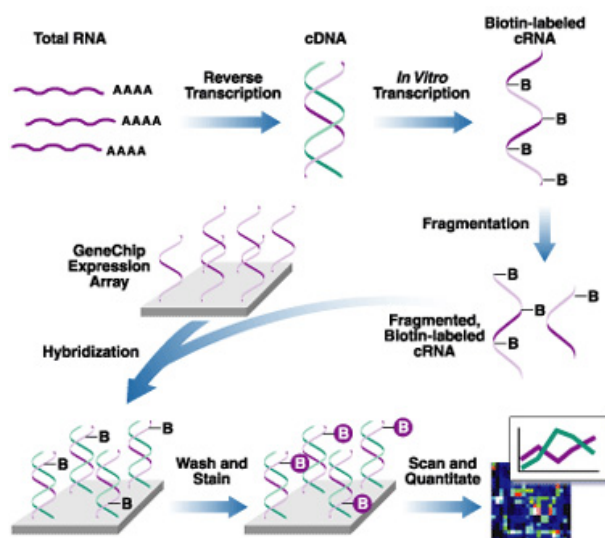


Abb. II.3: Darstellung des Verfahrens zur Messung der Genexpression mittels DNA-Mikroarray-Hybridisierung.

Schritte: Synthese der Biotin-markierten cRNA, cRNA-Fragmentierung, Hybridisierung, Färbung und Scannen. (Quelle der Abbildung: http://www.affymetrix.com/technology/ge_analysis/index.affx)

8.4 Auswertung der Daten

Mit Hilfe der Genechip MicroArray Suite Version 5.0 Software wurde zunächst das Bild der Hybridisierung generiert, dann wurde eine absolute Analyse durchgeführt: Die Signalintensitäten („Average Differences“) und die sogenannten „Absolute calls“ wurden bestimmt. Die Absolute calls definieren ein Transkript als vorhanden (P für „Present“), nicht vorhanden (A für „Absent“) oder im Grenzbereich liegend (M für „Marginal“). Dabei erfolgte eine Normierung der Intensitäten (globale Skalierung) jedes Mikroarrays auf eine Ziel-Intensität von 1000 Einheiten, damit Unterschiede in der Menge und der Qualität der cRNA-Proben und andere Variablen kompensiert wurden. Um differentiell exprimierte Gene zu ermitteln, wurden die Daten zweier Hybridisierungen mit Hilfe der Software MicroArray Suite 5.0 (Affymetrix) verglichen. In dem „comparison analysis“ wurden die mit Tetracyclin induzierten Zellen (+Tet) mit den nicht behandelten Kontrollzellen (-Tet) verglichen. Der Array mit den Kontrollzellen (-Tet) wurde als Basislinie (oder Kontrolle) definiert, der Array mit den behandelten Zellen (+Tet) als experimenteller Array (Experiment). Die Werte jeder Probe auf dem Kontroll-Array wurden mit den entsprechenden Werten des experimentellen Arrays (Experiment) verglichen. Die Datei des Vergleichs wurde weiterhin mit der Affymetrix Data Minig Tool 3.0 Software gefiltert.

9 Quantitative Real-time PCR

Die Quantifizierung von spezifischen mRNAs erfolgte durch eine Reverse Transkription (RT) mit nachgeschalteter quantitativer Real-time PCR (Echtzeit-PCR). Bei der Real-time PCR erfolgt eine Fluoreszenzmessung der DNA-Menge während oder nach jedem Zyklus der PCR und ermöglicht somit eine quantitative Bestimmung der anfänglichen DNA-Menge.

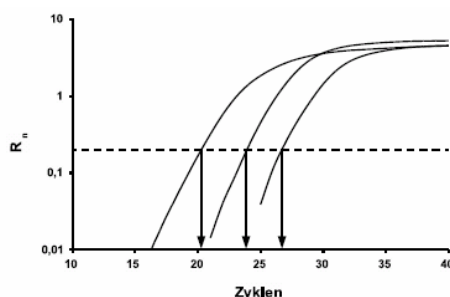


Abb. II.4: Produktamplifizierung bei der Real-time PCR. Dargestellt sind fiktive Kurvenverläufe mit von links nach rechts abnehmender Expressionstärke. Bei den zu höheren Zyklenzahlen gelegenen Kurven wird dieselbe Fluoreszenzintensität (R_n) (Schwellenwert) erst später erreicht.

Als Parameter für die Bestimmung der anfänglichen DNA-Menge wird in der exponentiellen Phase der PCR der C_T -Wert (threshold cycle) berechnet, der die Zykluszahl angibt, bei der die Fluoreszenz einen festgelegten Schwellenwert überschreitet.

9.1 RNA-Isolierung

Für den Einsatz in der Real-time PCR wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen einer 10cmØ-Schale mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Der Zellaufschluss und die RNA-Isolierung erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers. Ein DNase-Verdau mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen) wurde durchgeführt. Abschließend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt, die RNA-Proben aliquotiert und bei –80 °C eingefroren.

9.2 cDNA-Synthese

Zur Synthese von zu mRNA komplementärer DNA (cDNA) wurde die isolierte Gesamt-RNA einer reversen Transkription mit Random Hexameren unterzogen.

Für TaqMan-Sonden (TaqMan Gene Expression Assay) und SYBRGreen

Für TaqMan-Sonden (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems)- und SYBRGreen-Versuche wurde die cDNA mit dem Omniscript-RT-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Sämtliche Bestandteile bis auf die Random Hexamere (Boehringer Mannheim) wurden dem Qiagen-Kit entnommen. Der Ansatz für die Reaktion beinhaltete 1 µg Gesamt-RNA, 10 Units Omniscript Reverse Transkriptase, dNTP-Mix (500 µM je dNTP), 10 Units RNase Inhibitor (RNase out), 1x Reverse Transkriptase-Puffer und 1,25 µM Random Hexamere. Das Volumen des Ansatzes betrug 20 µl. Die cDNA-Proben wurde bei - 20°C gelagert.

Für TaqMan Low Density Array

Für den TaqMan Low Density Array-Versuch wurde die cDNA mit dem High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Dabei wurden 5 µg Gesamt-RNA in einem Endvolumen von 50 µl reverse transkribiert.

9.3 Quantitative Real-time PCR mit SYBRGreen, TaqMan-Sonden und TaqMan Low Density Array

Alle Real-time PCR Reaktionen wurden nach denselben Bedingungen durchgeführt. Nach einer 10 min Inkubation bei 95°C (Aktivierung der HotStar Taq-Polymerase durch Denaturierung eines Inhibitorproteins) folgten 40 Zyklen mit 15 s bei 95°C (Denaturierung) und 60 s bei 60°C (Annealing-Extension).

Sowohl bei SYBRGreen als auch bei den TaqMan-Sonden erfolgte die Amplifikation und Detektion von cDNA mit dem GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) und der zugehörigen Software.

SYBRGreen

Der zur DNA-Quantifizierung verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen interkaliert während der Primer-Verlängerungsreaktion in die neu gebildete doppelsträngige DNA und fluoresziert nach Anregung durch eine Halogenlampe. Die emittierte Fluoreszenz ist linear zur Konzentration der gebildeten DNA-Moleküle. Die verwendeten genspezifischen Primer (s. Tab. II.6) wurden mit dem Programm Primer Express (Applied Biosystems) gemäß den Vorgaben berechnet. Eine Überprüfung auf unspezifische Produkte (z. B. Primer-Dimere) erfolgte nach abgeschlossener PCR mittels einer Schmelzpunktanalyse im Thermocycler. Dies ermöglichte die Differenzierung zwischen kurzen, bei niedriger Temperatur schmelzenden Primer-Dimeren und den längeren spezifischen PCR-Produkten.

Der SYBRGreen PCR Master Mix von Applied Biosystems wurde verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Die Primer lagen in einer Konzentration von 0,25 µM vor, und die c-DNA wurde 1:100 verdünnt.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Villin forward	CCCTGGAGCAGCTAGTGAACA
Villin reverse	CATCGAGGCAGAGCAGAGAAG
SEPP1 forward	TGAATCTTGTCAGTGACGTTTGC
SEPP1 reverse	TTTGCCTGATTCTTTCAGCGT
GAPDH forward	GTCAGTGGTGGACCTGAC
GAPDH reverse	ACCTGGTGCTCAGTGTAG

Tab. II.6: Verwendete Primer für die Real-time PCR mit SYBRGreen.

TaqMan- Sonden (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems)

Der so genannte „TaqMan Gene Expression Assay“ der Firma Applied Biosystems enthält die zwei Primer und die TaqMan-Sonde für die spezifische Amplifikation eines Gens. Abbildung II.5 zeigt das TaqMan-Prinzip.

In den Real-time PCR Reaktionen mit TaqMan-Sonden betrug das Reaktionsvolumen 20 µl. 1 µl einer 1:4 verdünnten cDNA wurde mit 1 µl TaqMan Gene Expression Assay (20×), 10 µl TaqMan PCR Master Mix (2×)(Applied Biosystems) und 8 µl H₂O gemischt.

Gen	TaqMan Gene Expression Assay	Gen	TaqMan Gene Expression Assay
WT1	Hs00240913_m1	18sRNA	Hs99999901_s1
DSC2	Hs00245200_m1	GAPD	Hs99999905_m1
MTM1	Hs00169680_m1		
SELEBP1	Hs00187625_m1		
SEPP1	Hs00193657_m1		
Villin 1	Hs00200229_m1		
PKP2	Hs00428040_m1		
CIDEB	Hs00205339_m1		

Tab. II.7: Verwendete „TaqMan Gene Expression Assays“ (Applied Biosystems).

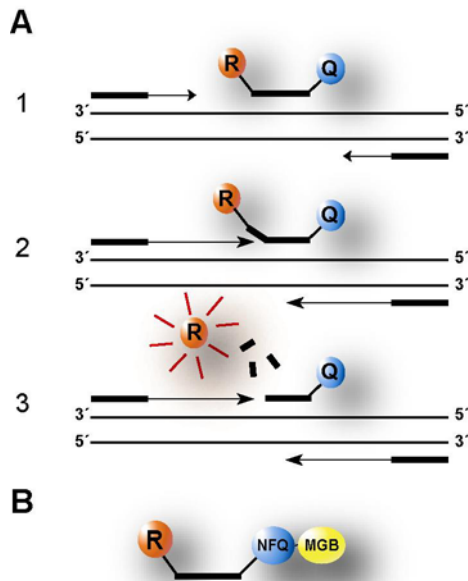


Abb. II.5 : Schematischer Verlauf der Sondenhydrolyse bei der TaqMan PCR. (A) (1) Primer und Fluoreszenzmarkierte Sonde binden (Annealing) spezifisch an die einzelsträngige DNA. Die Sonde ist mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen versehen, wovon der Quencher (Q) die Fluoreszenz des Reporters (R) unterdrückt. Die Polymerase erkennt den Primer-DNA-Doppelstrang und beginnt mit der Synthese des vollständigen Doppelstranges (Extension). (2) Während der Extensionsphase trifft die DNA-Polymerase auf die gebundene Sonde. (3) Durch die 5'-3' Exonuclease Aktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase wird dann die Sonde hydrolysiert. Reporter und Quencher werden getrennt, wodurch der Reporter in Lösung geht und eine messbare Fluoreszenz abgibt.

(B) TaqMan-Sonde im „TaqMan Gene Expression Assay“. Die Sonde hat am 5'-Ende einen Reporter (6-FAM). Am 3'-Ende ist ein nichtfluoreszierender Quencher (NFQ), so dass das Real-time Detektionssystem den emittierenden Reporterfarbstoff präziser messen kann. Weiter ist am 3'-Ende ein minor groove binder (MGB) lokalisiert, der eine Erhöhung der Schmelztemperatur der Proben verursacht.

TaqMan Low Density Array

Die quantitative Real-time PCR wurde auch mittels TaqMan Low Density Array (= Micro Fluidic Card, Applied Biosystems) durchgeführt. Bei diesem System sind die TaqMan-Sonden + Primer (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems) auf einer Micro-Fluidic-Karte lyophilisiert. Die Karte besteht aus 384 wells, die über Kanäle miteinander verbunden sind. Mehrere Konfigurationen sind möglich. Für die Validierung der Mikroarray-Daten wurde eine Konfiguration ausgesucht, in der 96 TaqMan Gene Expression assays zweimal als Duplikate auf der Karte vorhanden waren, und in der zwei cDNA-Proben pro Karte getestet werden konnten (Abb. II.6). Da auf der Karte drei Referenzgene vorhanden waren, und da für mehrere Gene mehr als ein TaqMan Gene Expression Assay ausgesucht wurde, wurden mit dem Array insgesamt 82 Gene analysiert (Tab. II.8).

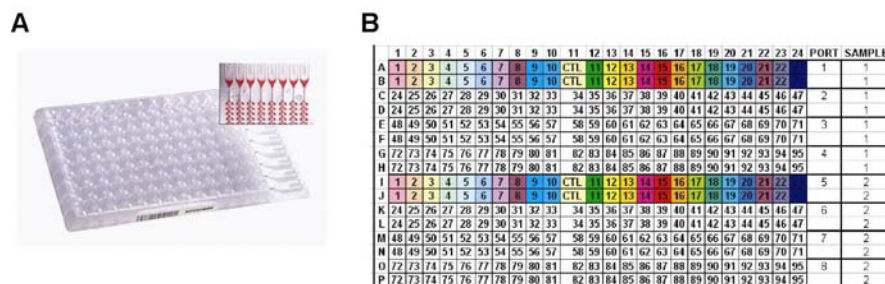


Abb. II.6: TaqMan Low Density Array (Applied Biosystems). (A) TaqMan Low Density Array = Micro-Fluidic-Card (Applied Biosystems) Die Micro Fluidic Card besteht aus 384 wells, die über Kanäle miteinander verbunden sind. (B) Konfiguration des verwendeten TaqMan Low Density Arrays. 95 TaqMan Gene Expression Assays + 1 Kontrolle, 2 Replikate für jedes Transkript, 2 cDNA-Proben pro Karte.

Tab. II.8: Konfiguration des TaqMan Low Density Arrays.

TaqMan Low Density Array	Anzahl
TaqMan Gene Expression Assays (TaqMan-Sonde +Primer)	96
Referenzgene	3 (GAPD, 18sRNA, ACTB)
2 TaqMan Gene Expression Assays für ein Gen	9 (ABCB1, ABCB4, ACOX1, ALDH5A1, COBL, CRAT, LOC57228, NULL, SELENBP1)
3 TaqMan Gene Expression Assays für ein Gen	1 (ITGB4BP)
Analysierte Gene	82

In der Tabelle II.9 sind die 96 assays aufgeführt.

Tab. II.9: Konfiguration des TaqMan Low Density Arrays (Applied Biosystems).

Gensymbol	Genname	Assay ID
18s rRNA	Eukaryotic 18S rRNA	Hs99999901_s1
GAPD	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1
ACTB	actin, beta	Hs99999903_m1
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	Hs00184500_m1
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	Hs00184491_m1
ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	Hs00251620_m1
ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	Hs00240956_m1
ACADVL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	Hs00817723_g1
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	Hs00244515_m1
ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	Hs00244513_m1
ACY1	aminoacylase 1	Hs00167402_m1
AGXT2L1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	Hs00229818_m1
AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1	Hs00177481_m1
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	Hs00233455_m1
ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	Hs00542444_m1
ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	Hs00153566_m1
ATP7B	ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide (Wilson disease)	Hs00163739_m1
BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	Hs00357350_m1
C14orf78	chromosome 14 open reading frame 78	Hs00746838_s1
CCNH	cyclin H	Hs00236923_m1
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Hs00270923_s1
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Hs00153439_m1
CIDEB	cell death-inducing DFFA-like effector b	Hs00205339_m1
CLN6	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6, late infantile, variant	Hs00608557_m1
COBL	KIAA0633 protein (Interim)	Hs00323596_m1
COBL	KIAA0633 protein (Interim)	Hs00391205_m1
COL21A1	collagen, type XXI, alpha 1	Hs00229402_m1
CRAT	carnitine acetyltransferase	Hs00241350_m1
CRAT	carnitine acetyltransferase	Hs00241357_m1
CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	Hs00171642_m1
DBI	diazepam binding inhibitor	Hs00220950_m1
DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	Hs00203889_m1
DSC2	desmocollin 2	Hs00245200_m1
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	Hs00610256_g1
DYRK1B	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B	Hs00245076_m1
EPHA2	EphA2	Hs00171656_m1
ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	Hs00176538_m1
FLJ13236	hypothetical protein FLJ13236 (Interim)	Hs00227689_m1
FLJ13612	likely ortholog of neuronally expressed calcium binding protein (Interim)	Hs00368816_m1
FLJ14146	hypothetical protein FLJ14146 (Interim)	Hs00226770_m1
GAB1	GRB2-associated binding protein 1	Hs00157646_m1
GAS1	growth arrest-specific 1	Hs00266715_s1
GPR49	G protein-coupled receptor 49	Hs00173664_m1
HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	Hs00232618_m1
HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	Hs00606658_g1

HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	Hs00230853_m1
IF	I factor (complement)	Hs00173409_m1
IL18R1	interleukin 18 receptor 1	Hs00175381_m1
IRS2	insulin receptor substrate 2	Hs00275843_s1
ITGA6	integrin, alpha 6	Hs00173952_m1
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	Hs00158272_m1
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	Hs00742156_m1
ITGB4BP	integrin beta 4 binding protein	Hs00794124_m1
KIAA0152	KIAA0152 gene product (Interim)	Hs00207082_m1
KIFAP3	kinesin-associated protein 3	Hs00183973_m1
LASP1	LIM and SH3 protein 1	Hs00196221_m1
LOC57228	hypothetical protein from clone 643 (Interim)	Hs00252748_s1
LOC57228	hypothetical protein from clone 643 (Interim)	Hs00377888_m1
MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	Hs00195458_m1
MAP3K11	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	Hs00176759_m1
MAPKAPK3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	Hs00177957_m1
MCP	membrane cofactor protein (CD46)	Hs00611257_m1
MGC33190	hypothetical protein MGC33190 (Interim)	Hs00381305_m1
MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	Hs00182064_m1
MPP1	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	Hs00609971_m1
MTM1	myotubular myopathy 1	Hs00169680_m1
NEFL	neurofilament, light polypeptide 68kDa	Hs00196245_m1
NELL2	NEL-like 2 (chicken)	Hs00196254_m1
NID	nidogen (enactin)	Hs00159600_m1
NK4	natural killer cell transcript 4 (Interim)	Hs00170403_m1
NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	Hs00196287_m1
NPR2L	homologous to yeast nitrogen permease (Interim)	Hs00198012_m1
OATPX	OATPX protein (Interim)	Hs00698884_m1
OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	Hs00213454_m1
OSBPL3	oxysterol binding protein-like 3	Hs00248922_m1
PEX3	peroxisomal biogenesis factor 3	Hs00186267_m1
PKP2	plakophilin 2	Hs00428040_m1
PPP1R1A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A	Hs00272698_m1
PRPH	peripherin	Hs00196608_m1
RBSK	ribokinase (Interim)	Hs00223231_m1
SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	Hs00198833_m1
SDC4	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	Hs00161617_m1
SEC23A	Sec23 homolog A (S. cerevisiae)	Hs00197232_m1
SELENBP1	selenium binding protein 1	Hs00187625_m1
SELENBP1	selenium binding protein 1	Hs00259932_m1
SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	Hs00193657_m1
SLC7A5	solute carrier family 7, member 5	Hs00185826_m1
SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)	Hs00167093_m1
TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	Hs00610617_m1
TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	Hs00417537_m1
TM4SF5	transmembrane 4 superfamily member 5	Hs00187639_m1
TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	Hs00188755_m1
TRIM9	tripartite motif-containing 9	Hs00364838_m1
UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	Hs00163365_m1
VIL1	villin 1	Hs00200229_m1
WT1	Wilms tumor 1	Hs00240913_m1

Bei den folgenden TaqMan Gene Expression Assays hat sich die Bezeichnung in der Zwischenzeit verändert: OATPX (jetzt SLC04C1), NPR2L (jetzt TUSC4), C14orf78 (jetzt NULL) und TACC2 (jetzt NULL). Gleiche Namensänderung in Affymetrix und Applied Biosystems: OATPX (jetzt SLC04C1).

Die Real-time PCR wurde nach Angaben des Herstellers auf dem ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. 1×TaqMan Universal PCR Mix (Applied Biosystems) und 4 µl cDNA Probe (= 400 ng RNA) wurden zu jedem Port des Arrays gegeben. Jede cDNA Probe wurde als Duplikat für jedes Gen getestet. GAPDH wurde

für die Normalisierung der RNA-Ladung verwendet. Die Genexpression wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, die den C_T -Wert der nicht induzierten und induzierten Zellen vergleicht, quantifiziert.

9.4 Berechnung der Genexpression

In allen durchgeführten Real-time PCR Experimente wurde das jeweilige Zielgen auf ein ubiquitär exprimiertes nicht reguliertes Referenzgen „Housekeeping Gen“ (18sRNA oder GAPDH) normalisiert. Von jeder cDNA wurde eine Dreifachbestimmung sowohl für das Zielgen als auch für das Referenzgen durchgeführt (Ausnahme: Low Density Array nur Doppelbestimmung).

Bei der Real-time PCR mit SYBRGreen und TaqMan-Sonden wurde für die Quantifizierung eine Standardkurve, die auf einer Verdünnungsreihe basierte, für das Zielgen und das Referenzgen verwendet. Die C_T -Werte der analysierten Proben wurden dann anhand der Standardkurven umgerechnet. In den durchgeführten Experimenten wurden immer die ermittelten Werte für die Transkripte in den induzierten und nicht induzierten Zellen ins Verhältnis gesetzt und so die Induktion („fold change“) für das jeweilige Transkript errechnet. Bei dem Low Density Array erfolgte die Auswertung der Expression nicht mit Standardkurven sondern mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Von jeder Doppelbestimmung wurde der Mittelwert gebildet und die Differenz der Mittelwerte von Ziel- und Referenzgen errechnet (ΔC_T). Die ΔC_T -Werte der Tet-behandelten Zellen (+Tet) wurden von den ΔC_T -Werten der Kontrollzellen (-Tet) subtrahiert ($\Delta\Delta C_T$ -Wert). Dann wurden die $\Delta\Delta C_T$ -Werte invers zur Basis 2 potenziert ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), so dass Werte > 1 einer stärkeren und Werte < 1 einer schwächeren Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen entsprechen.

10 Gen-Inaktivierung mittels RNAi

Zur Inhibierung der Genexpression wurde die erst seit kurzem etablierte Methode der RNA-Interferenz (RNAi) angewendet, mit der es möglich ist, spezifisch die Expression einzelner Gene auszuschalten bzw. zu modulieren. Bei der RNAi-Technik wird eine doppelsträngige siRNA (small interfering RNA) in die Zelle eingebracht. Die siRNA, die 21-23 Nukleotide lang ist und einen kurzen Überhang auf jeder Seite hat (Elbashir et al. 2001), bewirkt spezifisch die Degradation der komplementären mRNA oder hemmt das Gen auf Translationsebene mit der Folge, dass die Translation des Zielproteins für eine gewisse Zeit unterbunden wird (Nolan and Cogoni 2004). Die gezielte Gen-Inaktivierung kann durch die

Transfektion von synthetischen RNA-Molekülen (siRNA), PCR-Produkten (siRNA-Kassetten) oder siRNA-Vektoren erreicht werden.

10.1 siRNA-Kassetten

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Gen-Inaktivierungsexperimente siRNA-Kassetten eingesetzt. Diese sind PCR-Produkte, die aus einem Promotor (U6- oder H1-Promotor), einem DNA-Insert, der eine shRNA kodiert, und einer Terminationssequenz bestehen (Castanotto et al. 2002) (s. Abb. II.7A). shRNAs (short hairpin RNA) sind siRNA-ähnliche Moleküle, die in der Zelle durch das Dicer-Enzym zu siRNA-Moleküle gespalten werden (s. Abb. II.7B).

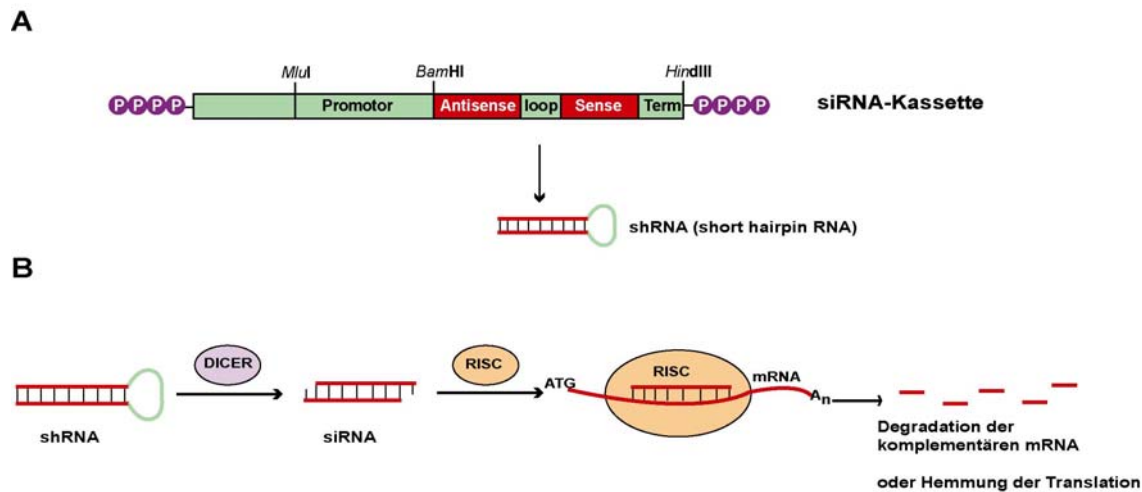


Abb. II.7: Schema der siRNA-Kassette (GenScript) und des RNA-Abbaus durch RNA-Interferenz. (A) Die siRNA-Kassette kodiert für eine short hairpin RNA (shRNA). Zu sehen sind die Schnittstellen, die für die Ligation und Restriktionsanalyse benutzt wurden. **(B)** In der Zelle werden die shRNA Moleküle durch DICER (Ribonuklease) in dsRNA Fragmente zerlegt (siRNA). Ein Strang der siRNA wird in dem RNA-inducing-silencing-complex (RISC) aufgenommen. Der RISC-Komplex bindet an die mRNA Moleküle deren Sequenz komplementär zur im RISC gebundenen siRNA ist und leitet deren Degradation ein. Das Resultat ist eine Inhibierung der Translation des entsprechenden Proteins.

Tab. II.10: Sequenz der verwendeten siRNA-Kassetten (GenScript).

siRNA-Kassette	<i>BamHI</i>	Antisense	Loop	Sense	<i>HindIII</i>
Villin(1)	GGATCCCG	ATGGACATAAGATGAGGTGG	TTGATATCCG	CCACCTCATCTTATGTCCATC	TTTTTCCAAAAGCTT
Villin(2)	GGATCCCG	CTAGCCACTTGAATCCACAG	TTGATATCCG	CTGTGGATTCCAAGTGGCTAG	TTTTTCCAAAAGCTT
WT1(1)	GGATCCCG	TGGCGGACTAATTCATCTGAC	TTGATATCCG	GTCAGATGAATTAGTCCGCCA	TTTTTCCAAAAGCTT
WT1(2)	GGATCCCG	TGTGTGGTTATCGCTCTCGTA	TTGATATCCG	TACGAGAGCGATAACCACACA	TTTTTCCAAAAGCTT
MTM1(1)	GGATCCCG	TCGTCCGCTAAGGCTAAGAGC	TTGATATCCG	GCTCTTAGCCTTACGCGACGA	TTTTTCCAAAAGCTT
MTM1(2)	GGATCCCG	TGAGGCACGATACGGAACCAC	TTGATATCCG	GTGGTTCGGTATCGTGCCTCA	TTTTTCCAAAAGCTT
HNF4 α (1)	GGATCCCG	TATGTTCTGCATCAGGTGAG	TTGATATCCG	CTCACCTGATGCAGGAACATA	TTTTTCCAAAAGCTT
HNF4 α (2)	GGATCCCG	TCTGTCCGTTGCTGAGGTGAG	TTGATATCCG	CTCACCTCAGCAACGGACAGA	TTTTTCCAAAAGCTT
HNF4 α (3)	GGATCCCA	TCTGTCCGTTGCTGAGGGTGA	TTGATATCCG	TCACCTCAGCAACGGACAGAT	TTTTTCCAAAAGCTT
HNF4 α (4)	GGATCCCA	TGTTCTGCATCAGGTGAGG	TTGATATCCG	CCTCACCTGATGCAGGAACAT	TTTTTCCAAAAGCTT

Die siRNA-Kassetten wurden von der Firma GenScript erworben. Die Auswahl der siRNA-Sequenz wurde mit dem Programm „siRNA Target Finder“ auf der GenScript-Webseite durchgeführt. Die Sequenz der angewandten siRNA-Kassetten ist in der Tabelle II.10 zusammengestellt.

10.2 Transiente Transfektion der siRNA-Kassetten

Die siRNA-Kassetten wurden mittels Lipofectamin (Invitrogen) mit Zugabe des Plus-Reagenzes (Invitrogen) nach den Angaben von GenScript (siRNA-Cassette Protocol) transfiziert. Für die Transfektion wurden 2×10^5 Zellen/well auf 12-well-Platten ausplattiert. Zu 100 μ l Optimem (Invitrogen) wurden 50-800 ng der jeweiligen siRNA-Kassette, 2,0 μ l Lipofectamine und 5 μ l Plus-Reagenz gegeben. Nach 3 Std. Inkubation wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium ersetzt. 24 - 48 Std. nach Transfektion wurde die Effizienz der siRNA-Kassetten durch Bestimmung der Transkriptmengen mittels Real-time PCR untersucht.

10.3 Stabile Transfektion der siRNA-Kassetten

Um die siRNA-Kassetten stabil in die Zellen durch die Methode der Flp-Rekombination einzubringen, die sich als sehr effektiv erwiesen hatte, wurde folgende Strategie benutzt. In dem Vektor pcDNA5/FRT/TO wurde ein Linker mit den Restriktionsschnittstellen *Mlu*I und *Hind*III reinkloniert (s. Abb. II.8).

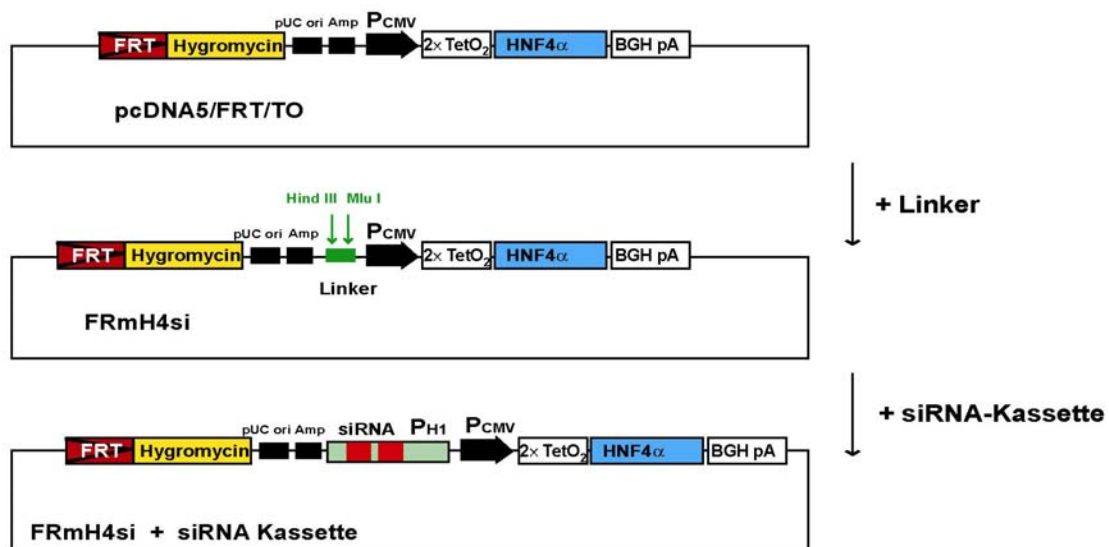


Abb. II.8: Schema der Konstruktion des FRmH4si-Vektors und Klonierung der siRNA-Kassetten. FRT: „Flp Recombination Target“, Flp-Rekombinase Erkennungssequenz, pUC ori: ColE1-Replikationsursprung, Amp: Ampicillin-Resistenzgen, P_{CMV}: Promotor des humanen Cytomegalovirus, 2xTetO₂: zwei Tet-Operator Sequenzen, BGH pA: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons, P_{H1}: Pol III-Promotor H1.

Diese Klonierung wurde von Sabine Senkel durchgeführt. Der entstandene Vektor wurde FRmH4si benannt. Dann wurden die zu klonierenden Kassetten mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *HindIII* geschnitten und in den *MluI-HindIII* geschnittenen FRmH4si Vektor kloniert.

Der Vektor FRmH4si + siRNA-Kassette wurde dann in der gleichen Weise wie der pcDNA5/FRT/TO-Vektor in die Flp-In T-REx 293 Zellen stabil transfiziert (s. II.6).

10.4 siRNA-Kassette gegen Luziferase als Positivkontrolle

Als Positivkontrolle wurde die kommerziell erhältliche siRNA-Kassette gegen Luziferase (H1siFLuc und U6siFLuc, GenScript) mit nachgewiesenem hohen Gen-inaktivierenden Effekt eingesetzt. Um deren Wirkung zu bestimmen, wurde diese zusammen mit einem Vektor, der für die Luziferase kodiert (pGL3-Control (Promega) oder CMV-Luc), in die Zellen transfiziert.

10.4.1 Luziferase-Assay

Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität transfizierter Zellen wurde das Luziferase-Assay-System von Promega laut Angaben des Herstellers verwendet. 24 oder 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 50 µl (12-well) bzw. 100 µl (6-well) Lysepuffer (25mM Triphosphat (pH 7,8), 2mM DTT, 2mM CDTA, 10% Glycerol, 1% Triton-X-100) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die lysierten Zellen wurden anschließend mit Hilfe eines Gummispatels von der Zellkulturschale gelöst, durch Vortexen kurz homogenisiert und 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. 5-20 µl des Überstands wurden in ein 5 ml Kunststoff-Röhrchen (Sarstedt) pipettiert. Im Luminometer (Lumat LB9501, Berthold) erfolgte dann die automatische Injektion von 100 µl Luziferase-Assay-Reagenz. Die entstehenden Lichtblitze wurden über einen Zeitraum von 20 s gemessen und sind proportional zur Luziferase-Enzymmenge und damit auch zur Luziferase-Genaktivität. Um die gemessene Lumineszenz auf die Anzahl der Zellen zu normalisieren, wurde die Proteingesamtkonzentration durch die Bradford-Methode bestimmt.

III Ergebnisse

1 Etablierung und Charakterisierung von HEK293 Zellen, die HNF4 α konditional exprimieren

Um den Effekt von HNF4 α auf die Proliferation zu analysieren, sollten zunächst Nierenzellen etabliert werden, die HNF4 α in einer induzierbaren Form exprimieren.

Als Modell für Nierenzellen wurde die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293, die kein endogenes HNF4 α exprimiert und gut charakterisiert ist, ausgewählt (Torban and Goodyer 1998). Für die Etablierung von HEK293 Zellen, die HNF4 α nach Induktion exprimieren, wurde die Zelllinie Flp-In T-REx 293 (Invitrogen), die sich von der HEK293 Zelllinie ableitet, eingesetzt. Die zwei großen Vorteile der Flp-In T-REx 293 Zelllinie sind, dass in ihrem Genom eine Erkennungssequenz für die Flp-Rekombinase (FRT-Sequenz) und der Tet-Repressor unter der Kontrolle des starken konstitutiven humanen CMV-Promotors stabil integriert sind. Durch die FRT-Sequenz wird mittels Flp-vermittelte Rekombination jeweils nur eine Genkopie in einen definierten Lokus der Zelllinie integriert, so dass alle etablierten Zellen das gleiche Expressionsverhalten zeigen. Der Tet-Repressor ermöglicht die induzierbare Expression des eingeführten Gens durch Zugaben von Tetracyclin.

Abbildung III.1 zeigt schematisch den Aufbau der Flp-In T-REx 293 Zelle und wie die Einführung von Transgenen funktioniert. Um ein Gen in die Zelllinie einzuführen, wird die entsprechende cDNA in den Vektor pcDNA5/FRT/TO, welcher eine FRT-Sequenz enthält, kloniert. Die Kotransfektion dieses Vektors zusammen mit dem Vektor pCSFlp1, der für die Flp-Rekombinase kodiert, führt dazu, dass die Flp-Rekombinase die Rekombination der zwei FRT-Stellen katalysiert, so dass das pcDNA5/FRT/TO-Plasmid an den FRT-Lokus integriert wird. Da das pcDNA5/FRT/TO-Plasmid ein Hygromycin-Resistenz-Gen enthält, können durch Hygromycin-Selektion die Zellen selektiert werden, in denen die Rekombination stattgefunden hat. Da keine vom Integrationsort abhängigen Expressionsunterschiede zu erwarten sind, kann nach der Hygromycin-Selektion auf eine Subklonierung verzichtet werden, und die entstandenen Kolonien können vereinigt werden.

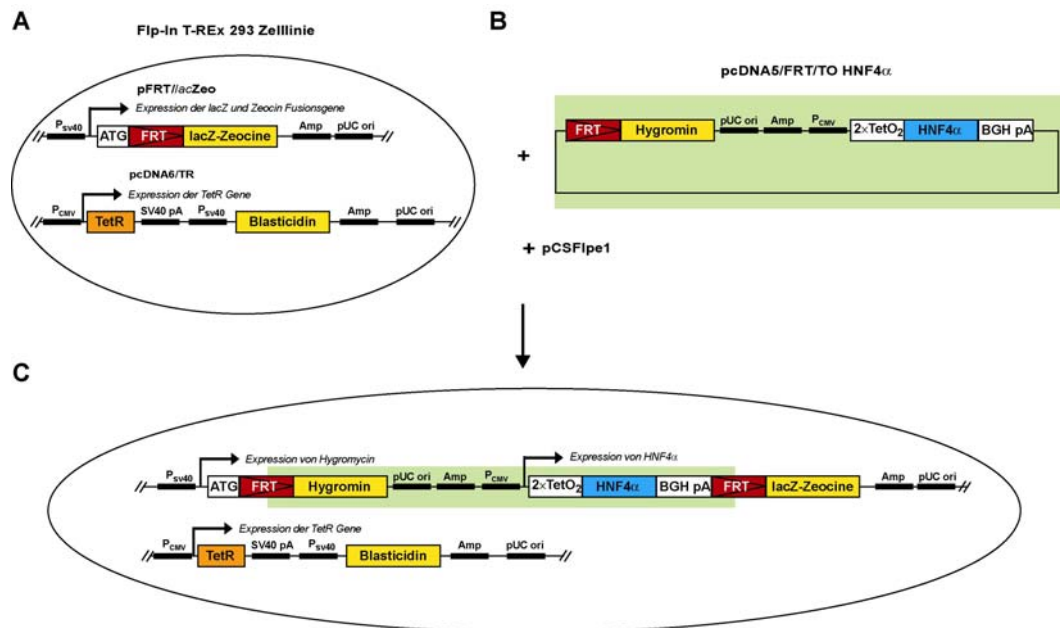


Abb. III.1: Schematische Darstellung der Etablierung der Flp-In T-REx 293 HNF4 α Zelllinie. (A) In der Flp-InTM T-RexTM 293 Zelllinie (Invitrogen) sind die Plasmide pFRT-lacZeo (FRT-Sequenz) und pcDNA6/TR (Tet-Repressor) stabil ins Genom integriert. (B) Die Flp-In T-REx 293 Zelllinie wurde mit dem pcDNA5/FRT/TO HNF4 α Vektor und dem Expressionsvektor pCSFLPe1 kotransfiziert und mit Hygromycin selektiert. (C) Durch homologe Rekombination wird das pcDNA5/FRT/TO-Plasmid ins Genom integriert. P_{SV40}: Promotor aus Simian Virus 40 (SV40), ATG: Start-Kodon, FRT: Flp-Rekombinase Erkennungssequenz, lacZ: lacZ-Gen, kodiert für β -Galaktosidase, Amp: Ampicillin-Resistenzgen, pUC ori: ColE1-Replikationsursprung, P_{CMV}: Promotor des humanen Cytomegalovirus, TetR: Tetracyclinrepressor, SV40 pA: SV40 Polyadenylierungssignal, 2 \times TetO₂: zwei Tet-Operator Sequenzen, BGH pA: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons.

Im integrierten Plasmid steht das Gen unter der Kontrolle des Tet-Operators, so dass das inserierte Gen durch das Tet-Repressor-Operator-System reguliert wird. Der Tet-Repressor (TetR), der in den Zellen konstitutiv exprimiert wird, bindet als Dimer an die Tet-Operatoren, wodurch die Transkription des Gens abgeschaltet wird. Wird Tetracyclin zum Medium gegeben, gelangt es durch passive Diffusion durch die Cytoplasmamembran in die Zelle und bindet an den Tet-Repressor. Diese Bindung induziert eine Konformationsänderung, die zum Verlust der Operatorbindefähigkeit des Repressors führt, und das Gen wird exprimiert.

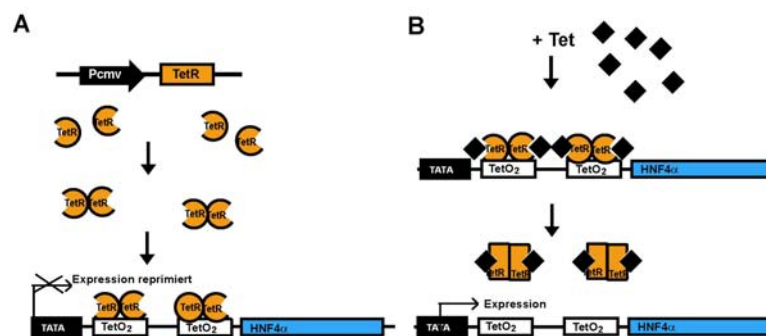


Abb. III.2: Schematische Darstellung der Induktion des stabil transfizierten Gens mit Tetracyclin. (A) Die Expression des Gens wird in der Zelle durch den Tet-Repressor reprimiert. (B) Die Zugabe von Tetracyclin (Tet) zum Medium führt zu der Induktion der Expression.

Die Zellen, die das Plasmid richtig einbringen, sollten nach Tet-Zugabe das eingeführte Gen exprimieren. Zusätzlich sollten sie das lacZ-Zeozein Gen nicht mehr exprimieren, da nach der Integration des Plasmids dieses Gen nicht mehr im offenen Leserahmen mit dem Initiationskodon steht.

Abbildung III.3 zeigt die Konstrukte, die in die Zellen eingebracht wurden. Die Spleißvariante HNF4 α 2, die aus der humanen Niere kloniert wurde (Drewes et al. 1996), wurde stabil transfiziert. Diese Spleißvariante ist durch eine 10 Aminosäuren umfassende Insertion in der C-terminalen F-Domäne charakterisiert (Sladek and Seidel 2001). Um die Spezifität der durch HNF4 α hervorgerufenen Effekte zu kontrollieren, wurden auch Zellen hergestellt, die die HNF4 α -Mutanten C106R und R154X exprimierten. Die Mutante C106R ist eine künstliche Mutante mit einer Punktmutation im zweiten Zinkfinger der DNA-Bindungsdomäne, die dominant negativ wirkt (DN-HNF4 α in (Taylor et al. 1996)). Dagegen ergibt die MODY1-assoziierte Mutante R154X durch die nonsense Mutation einen verkürzten HNF4 α -Transkriptionsfaktor, der seine meiste transkriptionelle Aktivität verloren hat (Laine et al. 2000; Lausen et al. 2000). Alle eingebrachten HNF4 α -cDNAs sind mit einer 5'-terminalen Sequenz, die einen sechsfachen myc-tag kodiert, fusioniert. Als weitere Kontrolle wurde die GFP („Green Fluorescent Protein“)-kodierende Sequenz ebenfalls in die Zellen eingebracht.

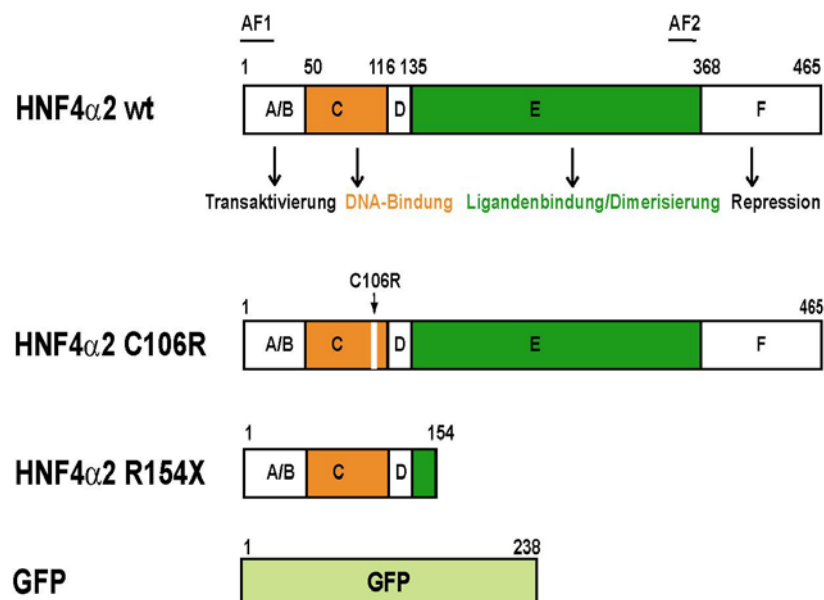


Abb. III.3: Schematische Darstellung der Konstrukte, die in die HEK293 Zellen eingebracht wurden. Die Domänenstruktur des HNF4 α -Proteins und die Lage der Mutationen sind angezeigt. Die HNF4 α wt-, HNF4 α C106R- und HNF4 α R154X-Genkonstrukte tragen am N-Terminus einen sechsfachen myc-tag (nicht eingezeichnet).

Für jedes Konstrukt wurden mindestens 5 unabhängige Zelllinien durch Poolen der durch Hygromycin-Selektion entstandenen Kolonien hergestellt. Die Zelllinien wurden mittels X-Gal-Färbung, Immunfluoreszenz und Western Blot getestet. Die Zelllinien, die keine messbare β -Galaktosidase-Aktivität zeigten, wurden für die weiteren Experimente ausgesucht. Zwei HNF4 α wt-Zelllinien (wt#1 und wt#4), eine Zelllinie für jede HNF4 α -Mutante (C106R#1 und R154X#6) sowie eine Zelllinie, die GFP enthält, wurden ausgewählt und in den Experimenten zur Untersuchung der HNF4 α -Funktion eingesetzt.

In Abbildung III.4 ist das Ergebnis des β -Galaktosidase-Tests dargestellt. In allen ausgewählten Zelllinien war die β -Galaktosidase-Aktivität fast vollständig verloren, was zeigte, dass die Flp-Rekombination in allen Zellen stattgefunden hatte.

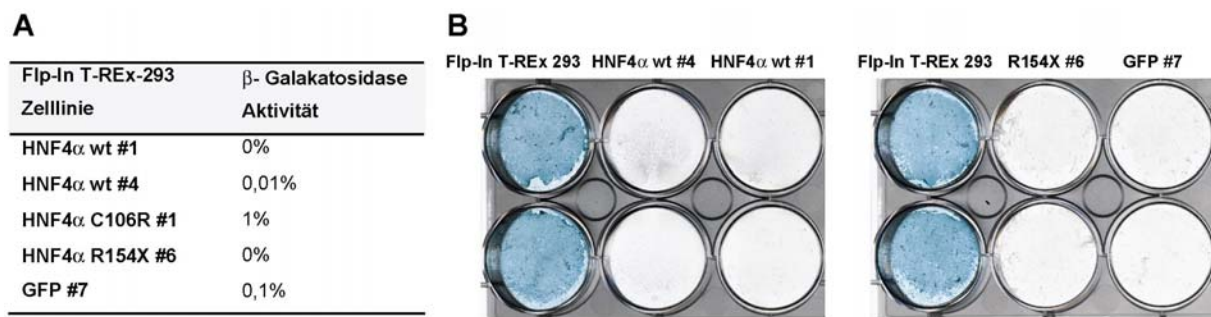


Abb. III.4: β -Galaktosidase-Test. (A) Mittels X-Gal-Färbung wurde der Anteil β -Galaktosidase-positiver Zellen ermittelt. (B) Aufnahme der Platten nach der LacZ-Färbung. Für jede Zelllinie wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die durch Tetracyclin induzierte Expression der HNF4 α -Konstrukte wurde in den etablierten Zelllinien mittels Western Blot und Immunfluoreszenz mit einem myc-spezifischen Antikörper (9E10) untersucht. Mittels Immunfluoreszenz wurde zunächst der Anteil der Transgen-positiven Zellen ermittelt (Abb. III.5A). In allen induzierten Zelllinien exprimierten 95-100% der Zellen das Transgen nach 24 Stunden Tet-Behandlung. Bei den Kontrollzellen, die nur mit Ethanol behandelt wurden, exprimierten höchstens 1% der Zellen das Transgen, während in dem Rest der Zellen nur unspezifische Hintergrundfluoreszenz erkennbar war. In der Immunfluoreszenz konnte auch die Lokalisation der Proteine beobachtet werden. Wie zu erwarten, wurde sowohl beim HNF4 α -Wildtyp als auch bei den HNF4 α -Mutanten eine nukleäre Lokalisation des Transkriptionsfaktors nachgewiesen, während das induzierte GFP cytoplasmatisch lokalisiert war (Abb. III.5B und C).

A

Flp-In T-REx-293 Zelllinie	Tetracyclin Induktion
HNF4 α wt #1	99%
HNF4 α wt #4	97%
HNF4 α C106R #1	99%
HNF4 α R154X #6	99%
GFP #7	98%

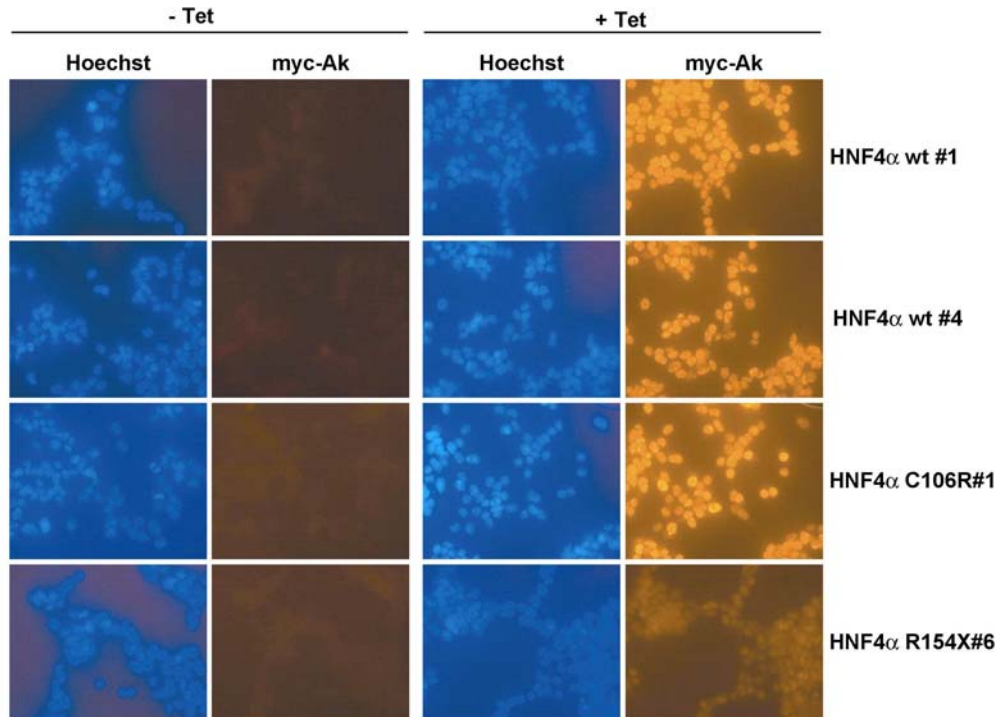
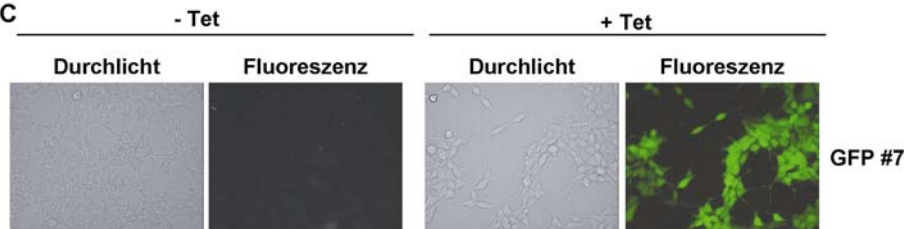
B**C**

Abb. III.5: Analyse der Induktion in den etablierten Zelllinien durch Immunfluoreszenz. (A) Der Anteil Transgen-exprimierender Zellen wurde nach 24 Std. Tetracyclin-Induktion durch Immunfluoreszenz bestimmt. (B) Kernfärbung mit Hoechst und Detektion von HNF4 α mit dem myc-spezifischen Antikörper 9E10. Die Zelllinien wt#1, wt#4, C106R#1 und R154X#6 wurden nur mit Ethanol behandelt (-Tet) oder für 24 Std. mit 1 μ g/ml Tetracyclin (+Tet) induziert. (C) GFP-Immunfluoreszenz. Phasenkontrast- und korrespondierende Immunfluoreszenzaufnahme. Bei allen Aufnahmen wird ein repräsentativer Ausschnitt gezeigt.

Mittels Western Blot wurde die Induktion in Abhängigkeit von der Tet-Konzentration in den HNF4 α wt-Zelllinien analysiert. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit 50 bis 1000 ng/ml Tet zu einer maximalen Expression von HNF4 α führte, während bei der Behandlung mit 10 ng/ml Tet die Menge an HNF4 α -Protein niedriger war (Abb. III.6A). In allen folgenden Experimenten wurde die Expression der eingeführten Gene durch die Behandlung der Zellen mit 1000 ng/ml Tetracyclin induziert.

Der zeitliche Verlauf der Induktion wurde ebenfalls durch Western Blot untersucht. Diese Analyse zeigte, dass in Abwesenheit von Tet kein Protein detektierbar war und dass die Zugabe von Tet zum Medium zu einer schnellen transkriptionellen Aktivierung aller HNF4 α -Gene führte. Drei Stunden nach Beginn der Induktion wurden bereits hohe Proteinmengen detektiert und nahmen kontinuierlich zu, bis nach 24 Std. ein Maximum erreicht wurde. Danach blieb die induzierte Proteinmenge konstant (Abb. III.6B). Das Ausmaß und der Verlauf der Induktion war in den Zelllinien HNF4 α wt#1, HNF4 α wt#4 und HNF4 α C106R#1 sehr ähnlich. Nur die Höhe der Induktion der MODY1-assoziierten Mutante R154X, die für einen verkürzten HNF4 α -Transkriptionsfaktor kodiert, war durchweg niedriger im Vergleich zu der Induktion der vollständigen Proteinen (Abb. III.6C).

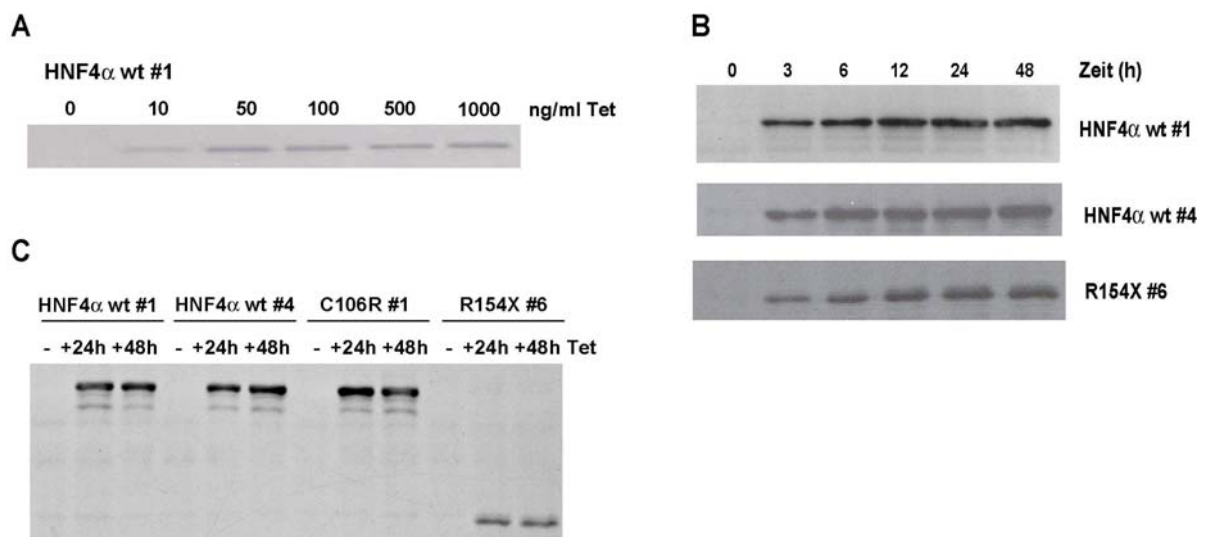


Abb. III.6: Analyse der Induktion in den etablierten Zelllinien durch Western Blot. Western Blots mit myc-spezifischem Antikörper 9E10. **(A)** Die Zelllinie HNF4 α wt #1 wurde mit den angegebenen Tet-Konzentrationen behandelt. Die Proteinextrakte wurden nach 24 Stunden aus den Zellen extrahiert und im Western Blot eingesetzt. **(B)** Zeitlicher Verlauf der Induktion mit 1 μ g/ml Tet in den Zelllinien wt#1, wt#4 und R154X#6. **(C)** Die Zelllinien wt#1, wt#4, C106R#1 und R154X#6 wurden für 48 Std. nur mit Ethanol behandelt oder für 24 bzw. 48 Std. mit 1 μ g/ml Tet induziert. 2 μ g Proteinextrakt wurde auf das Gel aufgetragen. Die Mutation R154X führt zu einem verkürzten Protein, das schneller als die vollständigen Proteine im Gel läuft.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung der Zelllinien, dass in Abwesenheit von Tetracyclin die Gene wirksam durch den Tet-Repressor gehemmt wurden und dass die Tetracyclin-Induktion der HNF4 α -Konstrukte in den verschiedenen etablierten Zelllinien sehr effizient und reproduzierbar war.

2 HNF4 α hemmt spezifisch die Proliferation von HEK293 Zellen

Um zu untersuchen, ob HNF4 α die Proliferation der neu etablierten Zellen beeinflusst, wurde die Wachstumsrate der nicht induzierten (-Tet) und induzierten Zellen (+Tet), die die verschiedenen HNF4 α -Konstrukte exprimieren, verglichen.

Zuerst wurde die Wachstumskinetik der Zelllinien durch Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer untersucht. Die Zelllinien wurden in An- und Abwesenheit von Tetracyclin kultiviert, und die Zellzahl wurde über 5 Tage bestimmt. Die beiden HNF4 α wt-Zelllinien wt#1 und wt#4 wuchsen in Anwesenheit von Tetracyclin langsamer. Dieser Effekt war ab dreitägiger HNF4 α -Induktion deutlich und nahm mit der Zeit kontinuierlich zu. Keine entsprechende Wachstumshemmung wurde in den Zelllinien, die die Mutanten C106R und R154X exprimieren, beobachtet. Nach Tetracyclin Behandlung der Zelllinien C106R#1 und R154X#6 wurde kein Unterschied in der Zellzahl gemessen (Abb. III.7A). Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass HNF4 α die Proliferation der HEK293 Zellen spezifisch hemmt.

Die Zellvermehrung der etablierten Zelllinien wurde auch mittels MTS-Test (CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) analysiert. Dieser Test misst die Proliferation anhand der metabolischen Aktivität der Zellen durch die kolorimetrische Messung des Umsatzes von MTS (s. II.7.2.2.). Mit dieser Messmethode wurde die Reduktion der Zellvermehrung durch HNF4 α bestätigt. Nach 2-tägiger HNF4 α wt-Induktion wurde eine 80%-ige Wachstumsinhibition beobachtet. Diese nahm mit der Induktionszeit weiter ab und erreichte eine bis zu 40%-ige Wachstumsinhibition nach 6 Tagen. Diese Reduktion war spezifisch auf die Expression von HNF4 α zurückzuführen, da die Expression der HNF4 α -Mutanten oder von GFP das Zellwachstum nicht beeinträchtigte (Abb. III.7B).

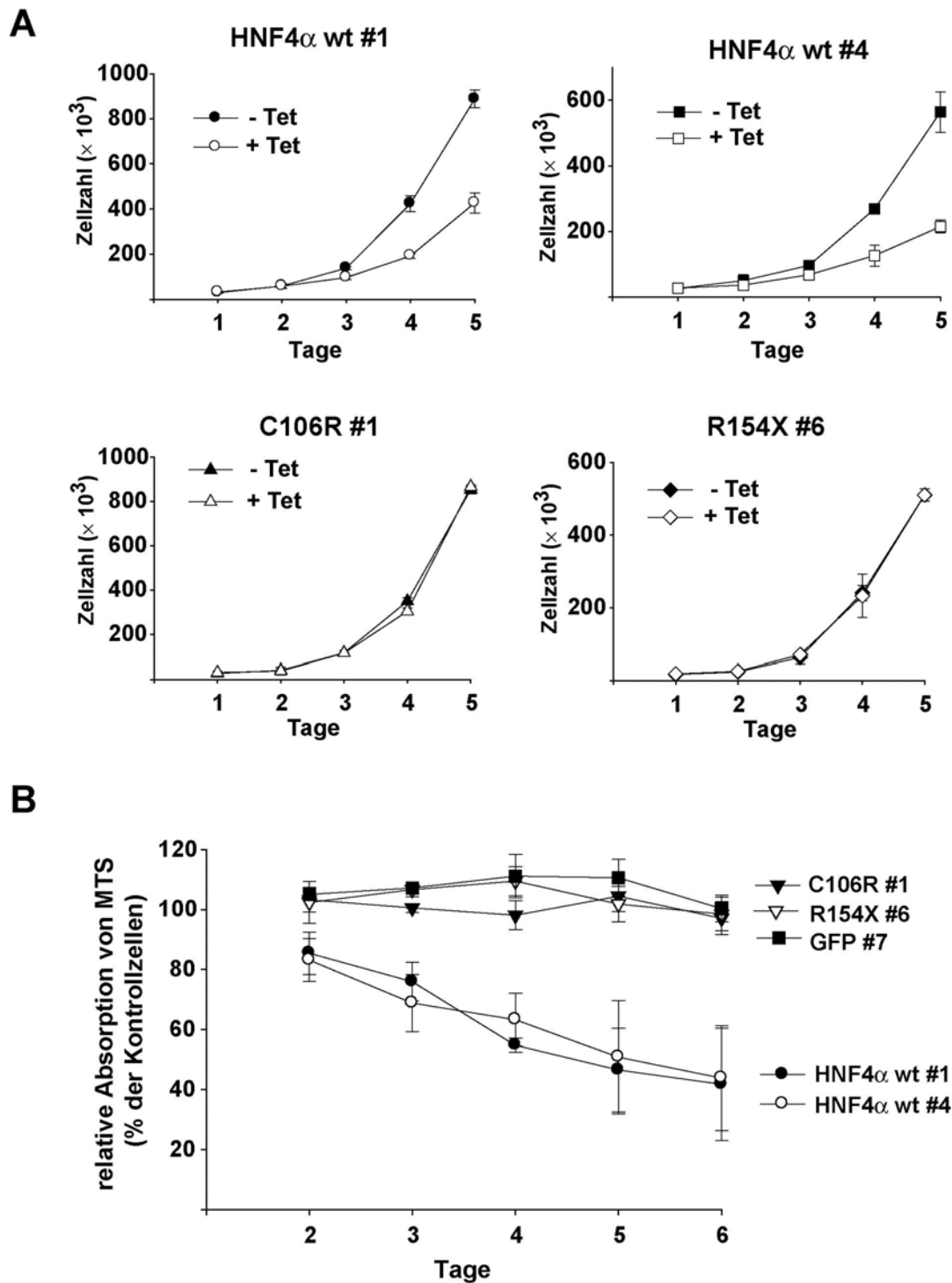


Abb. III. 7: HNF4 α hemmt spezifisch die Vermehrung der HEK293 Zellen. (A) Direkte Bestimmung der Zellzahl. 2×10^4 Zellen/well wurden in 12-well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden ohne (-Tet, geschlossene Symbole) oder mit Tetracyclin (1 $\mu\text{g/ml}$) (+Tet, offene Symbole) kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen trypsinisiert, und die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert einer Doppelbestimmung von zwei unabhängigen Ansätzen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Ergebnisse sind repräsentativ von mindestens drei Experimenten. (B) Kolorimetrische Bestimmung. Die Zellproliferation wurde mit dem CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS, Promega) gemessen. Die Zelllinien wurden 6 Tage lang ohne und mit Tetracyclin (1 $\mu\text{g/ml}$) kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Umsatz von MTS bei OD 490 nm ermittelt. Die Proliferation ist in Prozent der korrespondierenden Kontrollzellen angegeben. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten, die in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

2.1 HNF4 α führt nicht zu einer Reduktion des prozentualen Anteils der HEK293 Zellen in der S-Phase

Um den Effekt von HNF4 α weiter zu analysieren, wurde mittels BrdU-Assay (s. II.7.2.3) untersucht, ob HNF4 α zu einer Abnahme der Anzahl der Zellen in der S-Phase (Synthesephase) des Zellzyklus führt. Eine solche Abnahme würde auf eine Verringerung der Anzahl der proliferierenden Zellen hinweisen.

Die Messung des BrdU-Einbaus mittels BrdU ELISA zeigte, dass die Induktion von HNF4 α und nicht die Induktion der Mutanten zu einer Abnahme der Anzahl der S-Phase-Zellen führte. Jedoch korrelierte die Abnahme mit einer entsprechenden Abnahme der Zellzahl. Somit wurde keine signifikante Veränderung des prozentualen Anteils der S-Phase-Zellen beobachtet (Abb. III.8A).

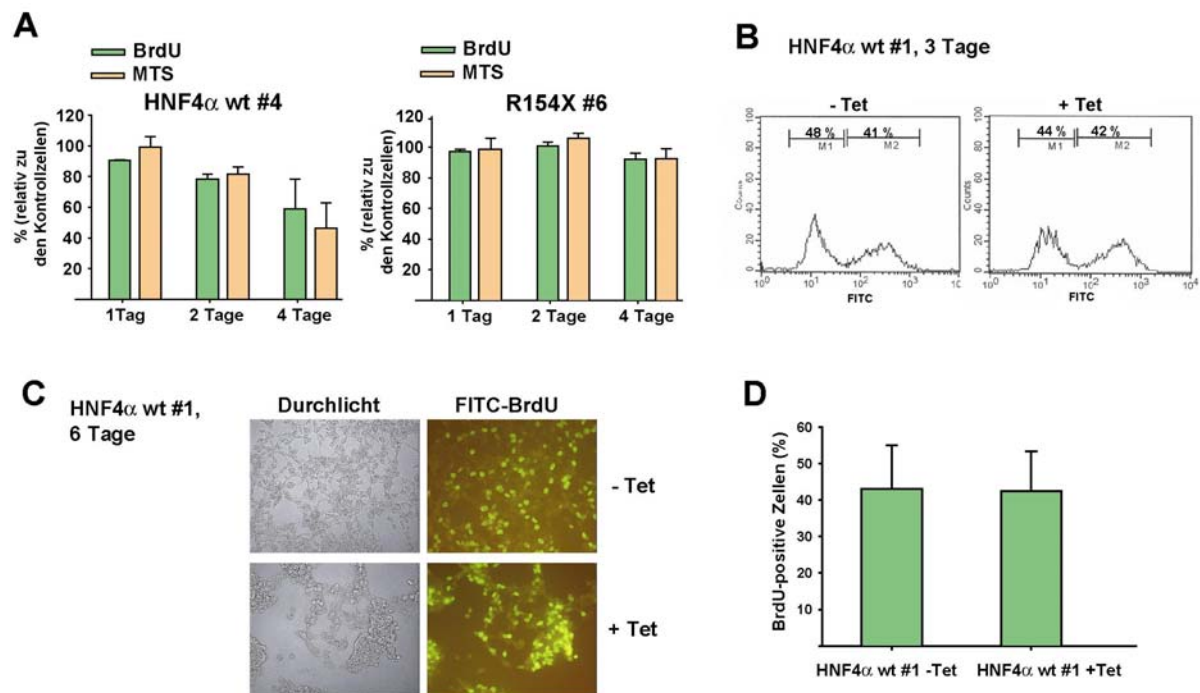


Abb. III.8: HNF4 α führt nicht zu einer Reduktion des Anteils an Zellen, welche die S-Phase erreichen. (A) Messung des BrdU-Einbaus mittels BrdU ELISA. Die Zelllinien wurden für 48 Std. in Medium mit 0,2% FCS synchronisiert und dann in Medium mit 10% FCS induziert oder unbehandelt gelassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden der BrdU-Einbau und die Zellzahl mittels MTS-Test untersucht. Die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) eines als Dreifachbestimmung angefertigten repräsentativen Experimentes sind jeweils in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen angegeben. (B) Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen mittels durchflusszytometrische Messung (FACS-Messung) mit FITC-gekoppelten Anti-BrdU Antikörper. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis der Kontrollzellen und der induzierten Zellen nach dreitägiger Tet-Induktion. Die Stärke der FITC-Floureszenzintensität ist im Histogramm gegen die relative Zellzahl aufgetragen. (C) Repräsentative Fluoreszenzaufnahme der nicht induzierten (-Tet) und induzierten Zellen (+Tet) der HNF4 α wt #1 Zelllinie nach 6 Tagen HNF4 α -Induktion. (D) Messung der Anzahl BrdU-inkorporierender Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie nach 6 Tagen HNF4 α -Induktion. Der durchschnittliche prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl wurde bestimmt. Pro Ansatz wurden 1500 Zellen gezählt. Das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes von vier voneinander unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

Dieses Ergebnis konnte durch FACS-Analyse (Abb. III.8B) und Fluoreszenzmikroskopie (Abb. III.8C und D) bestätigt werden. Sowohl in der Messung der BrdU-positiven Zellen durch FACS als auch in der Fluoreszenzmikroskopie wurde kein signifikanter Unterschied in der prozentuellen Anzahl BrdU-inkorporierender Zellen zwischen HNF4 α -exprimierenden (+Tet) und Kontrollzellen (-Tet) gemessen. Deshalb lässt sich schlussfolgern, dass die Expression von HNF4 α zu keiner Reduktion des Anteils an Zellen, welche die S-Phase erreichen, führt.

2.2 Die HNF4 α -Expression in HEK293 Zellen führt nicht zu einer Arretierung in einer der Phasen des Zellzyklus

Um die Ursache der verzögerten Zellvermehrung nach HNF4 α -Expression weiter zu analysieren, wurde eine Zellzyklusanalyse durchgeführt. Die Zellen wurden nach HNF4 α -Induktion hinsichtlich Zellzyklusarrest untersucht, da die proliferationshemmende Wirkung von HNF4 α auf einen Arrest der Zellen in einer der Phasen des Zellzyklus zurückzuführen sein könnte.

Die Zellzyklusverteilung wurde mittels Propidiumiodid-Färbung und FACS-Analyse (s. II.7.2.4) untersucht. Propidiumiodid (PI) ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, der zur Anfärbung der nukleären DNA verwendet wird.

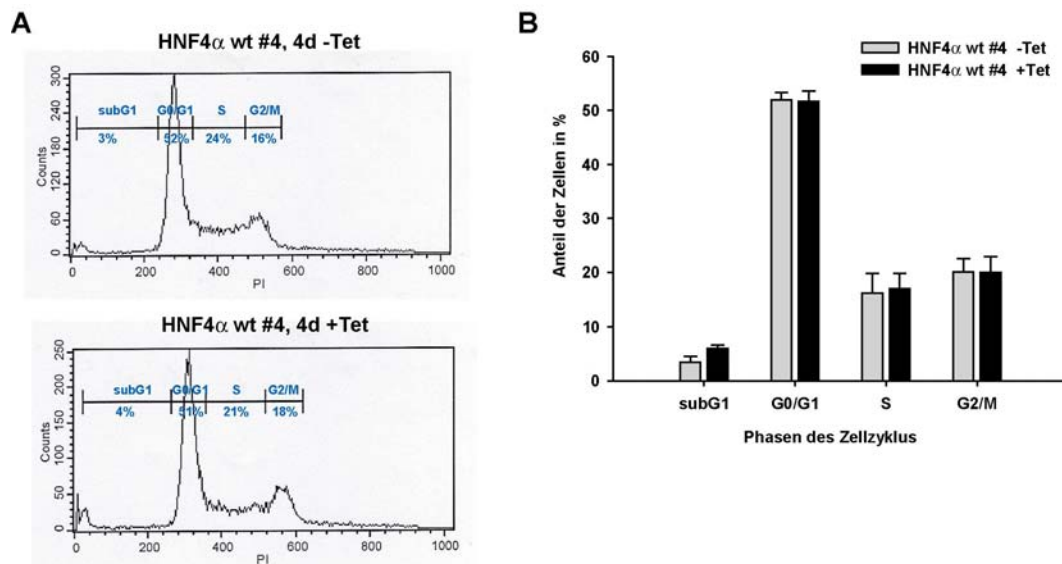


Abb. III.9: Die HNF4 α -Expression beeinflusst nicht die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen. (A) Repräsentatives Histogramm. Die Zelllinie HNF4 α wt #4 wurde für 4 Tage ohne oder mit Tetracyclin kultiviert. Nach Fixierung und PI-Färbung wurde die Verteilung der Zellpopulation mittels durchflusszytometrische Messung (FACS-Messung) analysiert. Die Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen (subG1, G0/G1, S-Phase, G2/M) ist in % angegeben. (B) Zellzyklusphasenverteilung nach 4 Tagen HNF4 α Induktion. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung einer Doppelbestimmung. Die Ergebnisse sind repräsentativ von drei voneinander unabhängigen Versuchen.

Nach 4 bis 7 Tagen HNF4 α -Induktion zeigten die induzierten und nicht induzierten Zellen das gleiche prozentuale Zellzyklusphasenverteilungsmuster. Kein Arrest in einer Phase des Zellzyklus konnte festgestellt werden (Abb. III.9). Dieses Ergebnis zeigt, dass die wachstumshemmende Wirkung von HNF4 α nicht auf eine Zellzyklusarretierung beruht.

2.3 HNF4 α induziert keine Apoptose in HEK293 Zellen

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Abnahme des Zellwachstums auf eine Induktion des apoptotischen Zelltods beruht.

Zunächst wurde durch Trypanblau-Färbung untersucht, ob die HNF4 α -Expression zu toxischen Prozessen und zum Zelltod (Nekrose) führt. Die Anzahl lebender und toter Zellen wurde nach unterschiedlichen HNF4 α -Induktionszeiten bestimmt. Nur ein geringer Prozentsatz der Zellen war positiv (< 5%), und kein Unterschied wurde zwischen HNF4 α -exprimierenden und Kontrollzellen festgestellt, so dass eine toxische Wirkung der HNF4 α -Überexpression ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die Apoptose-Induktion wurde durch die Messung der Aktivität der Caspasen 3 und 7, die eine entscheidende Rolle bei der Apoptose-Aktivierung spielen, untersucht. In Abbildung III.10A ist das Ergebnis des Caspase 3/7-Tests zu sehen. Der Test zeigte, dass die Expression von HNF4 α keine Apoptose induziert. Kein Unterschied wurde zwischen Kontrollzellen und HNF4 α -exprimierenden Zellen festgestellt. Als Kontrolle wurde auch die Apoptose-Aktivierung in den Mutanten-Zelllinien analysiert. In diesen wurde ebenfalls kein Unterschied zwischen Kontrollzellen und induzierten Zellen gemessen.

Zur Bestätigung, dass die Expression von HNF4 α die Apoptose nicht induziert, wurde ein Annexin-Test durchgeführt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, das früh in der Apoptose von der inneren Seite der Plasmamembran nach außen verlagert wird (Martin et al. 1995). Die Bindung von Annexin V an die Oberfläche der Zellen wurde durchflusszytometrisch und immunhistochemisch bestimmt. In allen Untersuchungen zeigte sich kein Anstieg der apoptotischen Zellen nach HNF4 α -Induktion (Abb. III.10B).

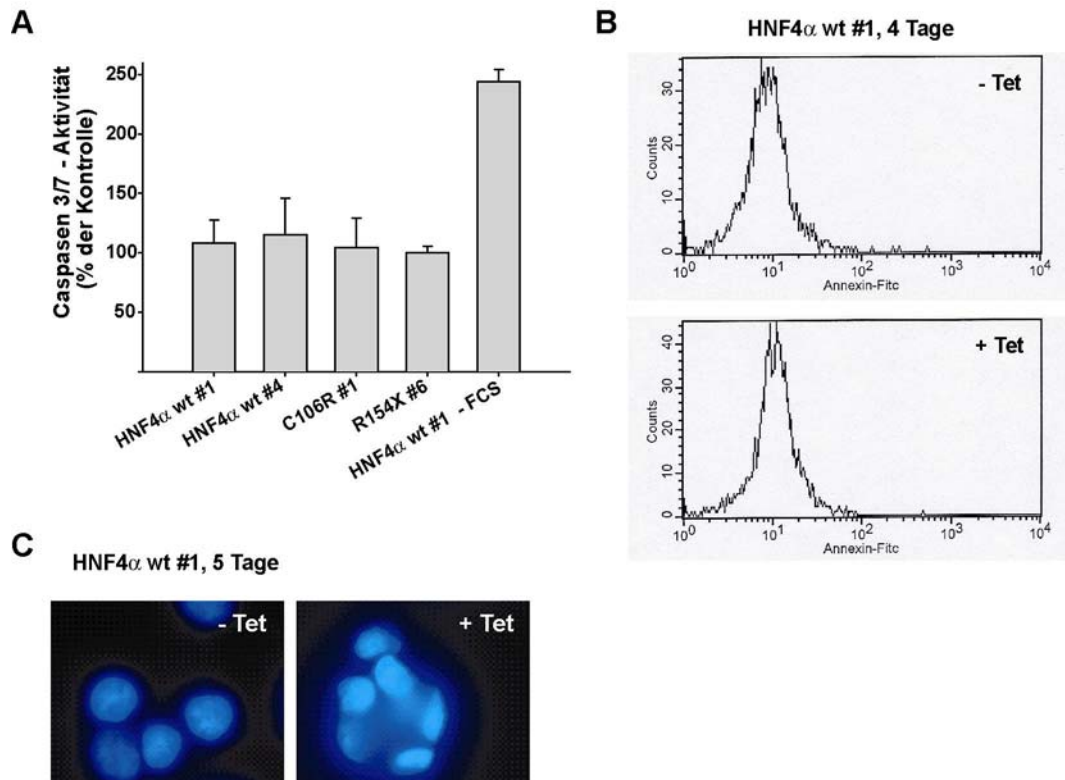


Abb. III.10: HNF4α führt nicht zu einem apoptotischen Zelltod der HEK293 Zellen. (A) Caspase 3/7-Test. Die Zelllinien mit den unterschiedlichen HNF4α-Konstrukten wurden auf 96-well-Platten ausgesät. Nach 3 Tagen Tetracyclin-Induktion wurde die Caspase-Aktivität mit dem Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) gemessen. Die Ergebnisse sind in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen angegeben. Die Zellzahl wurde in parallelen Platten mit dem MTS-Test ermittelt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von einem repräsentativen Experiment, das zweimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt wurde. Als Kontrolle wurde die Zelllinie wt#1 ohne FCS kultiviert, was zu einer Caspase-Aktivierung führt. **(B)** Annexin-Test. Repräsentatives Histogramm. Die Zelllinie HNF4α wt #1 wurde nach 4 Tagen Kultivierung ohne oder mit Tetracyclin mit Annexin V-FITC markiert und durchflusszytometrisch untersucht. Die Menge an gebundenem Annexin V (logarithmische Skala) ist gegen die relative Zellzahl aufgetragen. Ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen ist gezeigt. **(C)** Morphologische Analyse der Zellkerne durch Hoechst-Färbung.

Darüber hinaus wurde das Fehlen einer Apoptose-Induktion mit einer weiteren Methode bestätigt. Die morphologische Analyse der Zellkerne durch Hoechst-Färbung zeigte, dass nach HNF4α-Induktion sich die Morphologie der Zellen veränderte. Dennoch waren keine Zellen mit morphologischen Apoptosemerkmalen vorhanden (Abb. III.10C)

Die PI-Färbung in FACS, die zur Zellzyklus-Analyse eingesetzt wurde, zeigte ebenfalls keine apoptotischen Zellen nach HNF4α-Expression (s. Abb. III.9A), da kein signifikanter Anstieg der subG1-Population, der auf eine Induktion von Apoptose hindeuten würde, festgestellt werden konnte.

Insgesamt wurde in allen vier eingesetzten Methoden keine Evidenz eines apoptotischen Zelltods nach HNF4 α -Expression beobachtet, so dass eine Apoptose-Induktion durch HNF4 α ausgeschlossen werden kann.

Basierend auf diese Ergebnisse kommen wir zur Schlussfolgerung, dass HNF4 α das Wachstum der Nierenzellen HEK293 beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung beruht aber nicht auf eine Abnahme des prozentualen Anteils der Zellen in der S-Phase, auch nicht auf eine Änderung der Zellzyklusverteilung oder auf eine Induktion der Apoptose.

3 HNF4 α führt zu einer Änderung der Morphologie von HEK293 Zellen

Beim Beobachten der Zellen unter dem Mikroskop wurde deutlich, dass sich die Zellmorphologie nach der Induktion von HNF4 α im Verlauf der Zeit veränderte. Die morphologischen Veränderungen wurden durch Phasenkontrast, durch Färbung der Zellkerne mit Hoechst und durch Färbung der Aktinfilamente mit FITC-Phalloidin untersucht (Abb. III.11). Die Kontrollzellen, die eine polygonale, epitheliale Morphologie zeigten, bildeten bei Konfluenz einen kompakten Monolayer (Zellrasen) (-Tet in Abb. III.11). Dagegen wuchsen die Zellen, die HNF4 α exprimierten, nicht als epithelialer Monolayer. Ab den zweiten Tag nach HNF4 α -Induktion verloren die Zellen die typische homogene Struktur eines Monolayers. Die Zellen wechselten zu einem runden Phänotyp, die Zytoplasmaausläufer verschwanden, und die Zellen klumpten zusammen und bildeten teilweise kleine dreidimensionale Zellaggregate. Trotz der morphologischen Veränderungen lösten sich die Zellen nicht vom Boden der Kulturschalen ab (+ Tet in Abb. III.11). Die phänotypischen Veränderungen waren auf die Expression von HNF4 α wt zurückzuführen, da sie in den C106R-, R154X- und GFP-Zelllinien nicht auftraten (Daten nicht gezeigt).

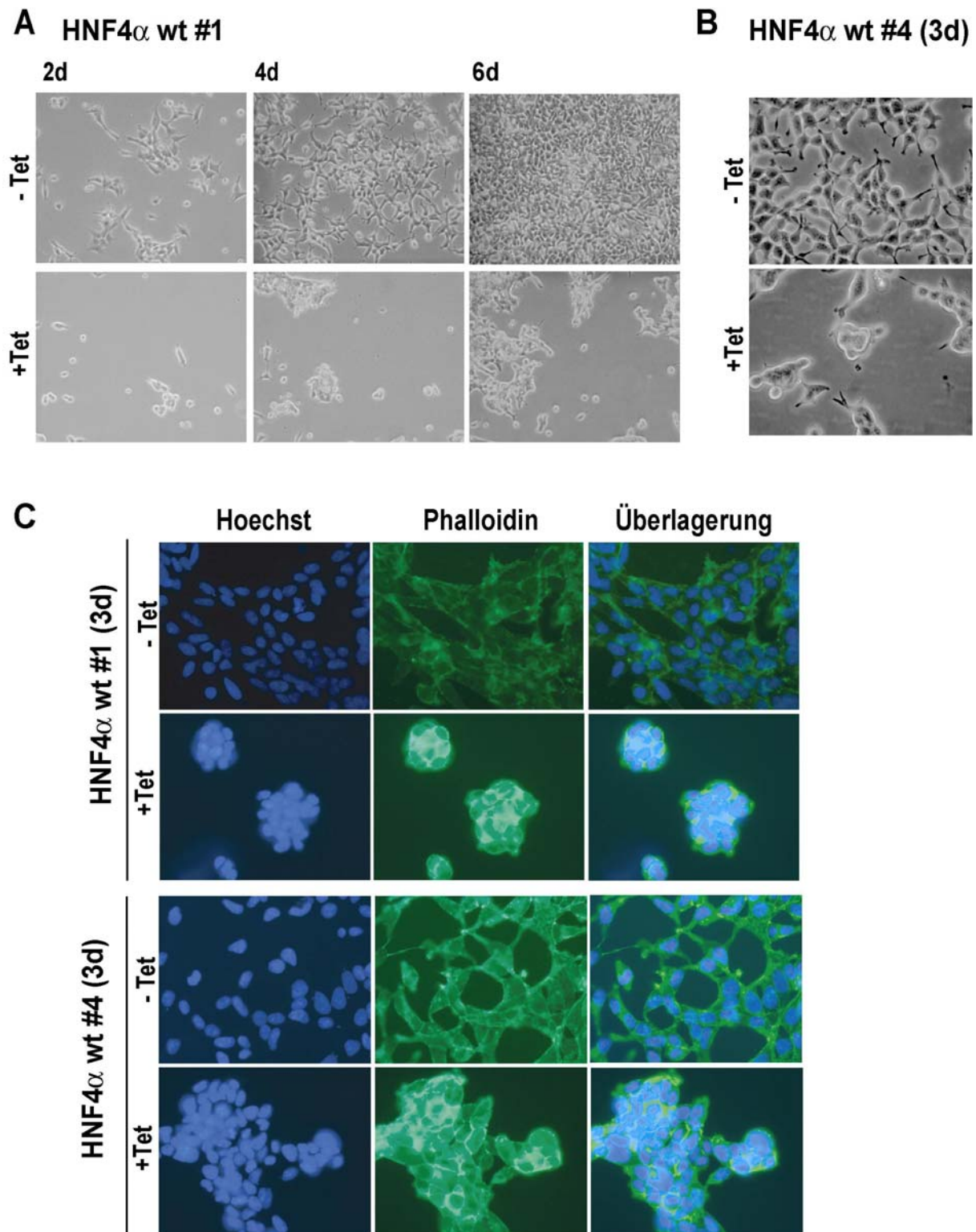


Abb. III.11: Die Induktion von HNF4 α führt zu einer Veränderung der Zellmorphologie von HEK293 Zellen. (A) Die Zelllinie HNF4 α wt #1 wurde ohne oder mit Tetracyclin kultiviert. Die Zellmorphologie wurde nach 2, 4 und 6 Tagen durch Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Der gleiche repräsentative Ausschnitt wurde zu allen Zeiten fotografiert. (B) Nahaufnahme in der Zelllinie HNF4 α wt #4 nach 3 Tagen Induktion. (C) Die Zelllinien HNF4 α wt #1 und HNF4 α wt #4 wurden für 3 Tage ohne oder mit Tetracyclin kultiviert. Färbung der nukleären DNA mit Hoechst (blau) und der intrazellulären F-Aktinfilamente mit FITC-gekoppeltem Phalloidin (grün). In der rechten Seite ist die Überlagerung der Hoechst und Phalloidin-Fluoreszenz zu sehen. Die Bilder zeigen repräsentative Ergebnisse von mehreren voneinander unabhängigen Versuchen.

4 Reversibilität der durch HNF4 α induzierte Effekte

Um zu analysieren, ob die von HNF4 α induzierten Veränderungen reversibel waren, wurden die Zellen für zwei Tage mit Tetracyclin behandelt und danach im Medium ohne Tetracyclin kultiviert. Bei der Untersuchung der Zellmorphologie im Phasenkontrastmikroskop konnte man erkennen, dass die Zellen, deren Morphologie sich nach HNF4 α -Induktion am Anfang veränderte, nach dem Entfernen des Tetracyclins zur normalen Form zurückkehrten (Abb. III.12A). Die Untersuchung der Proliferation mittels MTS-Test zeigte, dass die Zellen nach der Unterbrechung der HNF4 α -Expression deren normalen Wachstumsverhalten langsam zurückerlangten (Abb. III.12B). Aus den Ergebnissen lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die durch HNF4 α hervorgerufenen Effekte auf das Wachstum und die Morphologie der HEK293 Zellen reversibel sind.

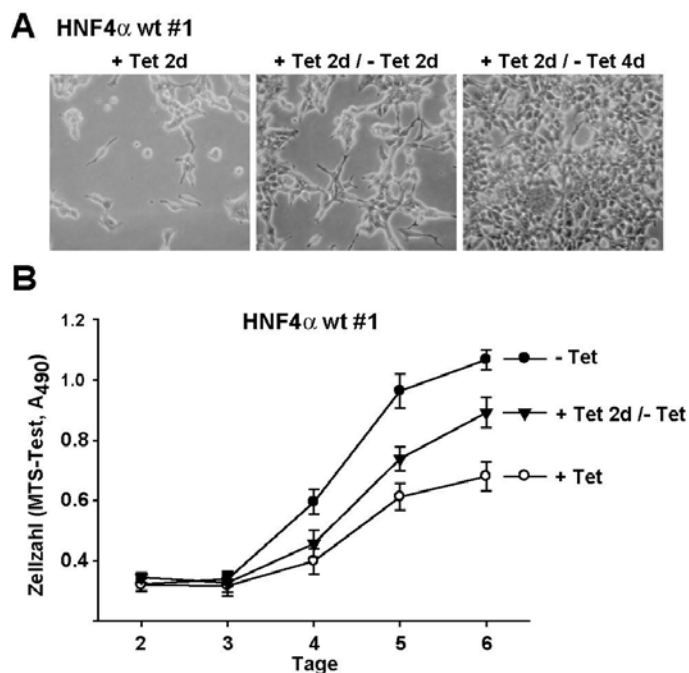


Abb. III.12: Die morphologischen und die Proliferationshemmung, die durch HNF4 α induziert werden, sind reversibel. Die Zelllinie HNF4 α wt #1 wurde für zwei Tage mit Tet induziert. Dann wurde das Medium mit Tet-freiem Medium ersetzt (+/- Tet). **(A)** Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Zellmorphologie nach 2 Tagen HNF4 α -Induktion und nach 2 und 4 Tagen Tet-freier Nachinkubationszeit. **(B)** Die Zellzahl wurde täglich mittels MTS-Test ermittelt. Die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) eines als Dreifachbestimmung angefertigten repräsentativen Experimentes sind jeweils angegeben.

5 Konzentrationsabhängigkeit der durch HNF4 α induzierte Effekte

In allen durchgeführten Experimenten wurde die Expression von HNF4 α durch die Behandlung der Zellen mit 1000 ng/ml Tetracyclin induziert, da mit dieser Tet-Konzentration das höchst mögliche Expressionsniveau erreicht wurde (s. Abb. III.6A). Um zu testen, wie

weit die HNF4 α -Überexpression über die physiologische Konzentration von HNF4 α lag, wurde das HNF4 α -Proteinniveau in den induzierten HEK293 Zellen mit dem Proteinniveau des endogenen HNF4 α in der humanen Hepatoma-Zelllinie HepG2 verglichen. Der Vergleich zeigte, dass die induzierte Menge an HNF4 α -Protein in den HEK293 Zellen etwa 5-mal höher als in HepG2 war (Abb. III.13A).

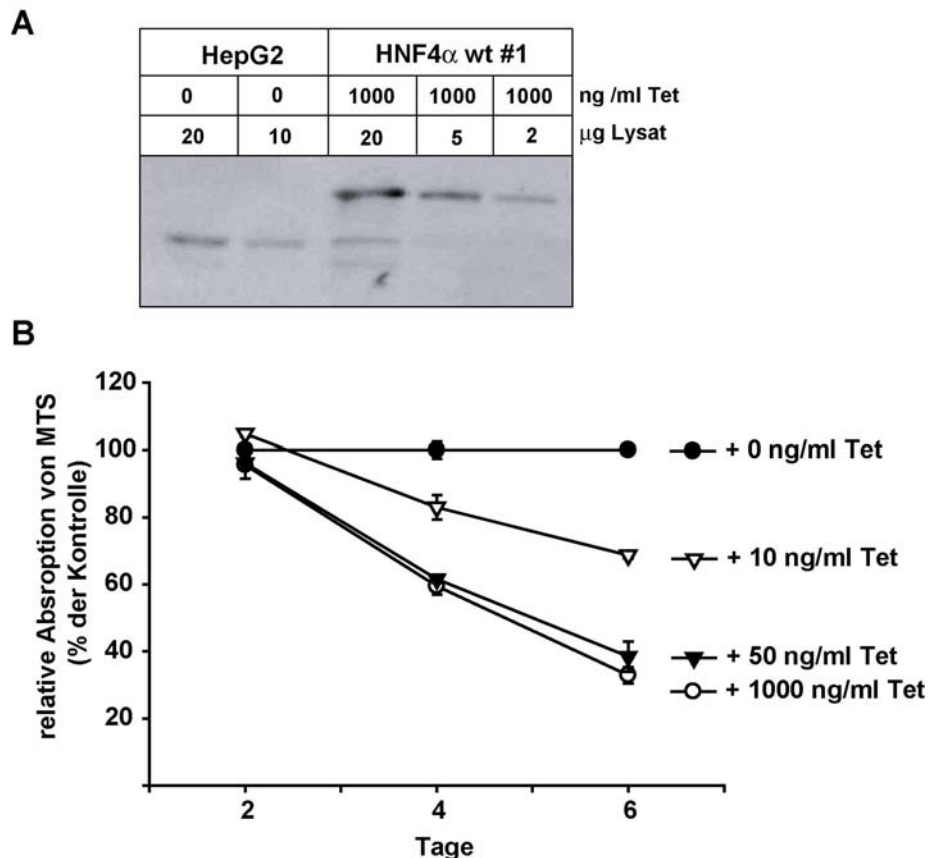


Abb. III.13: HNF4 α inhibiert konzentrationsabhängig die Proliferation. (A) Die Zelllinie HNF4 α wt #1 wurde für 24 Std. mit 1000 ng/ml Tet induziert und 20, 5 und 2 μ g Lysat wurden im Western Blot eingesetzt. Um das HNF4 α -Proteinniveau zu vergleichen, wurden 20 und 10 μ g Zelllysate der HepG2 Zelllinie im gleichen Blot analysiert. Das induzierte HNF4 α -Protein und das endogene HNF4 α der HepG2 Zelllinie wurden mit dem anti-HNF4 α Antikörper (c-19, Santa Cruz Biotechnology) detektiert. (B) Proliferationsmessungen nach Behandlung mit unterschiedlichen Tet-Konzentrationen mittels MTS-Test. Die Zelllinie HNF4 α wt #1 wurde mit Ethanol (0 ng/ml Tet) oder mit drei verschiedenen Tetracyclin-Konzentrationen (10, 50 und 1000 ng/ml Tet) behandelt. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurde das Zellwachstum mittels MTS-Test analysiert. Die Proliferation ist in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung einer Dreifachbestimmung. Das Ergebnis ist repräsentativ von zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Es stellte sich somit die Frage, ob eine niedrigere Konzentration an HNF4 α , die näher an den physiologischen Konzentrationen läge, die Proliferation ebenfalls beeinflusst. Die Analyse der Tetracyclin-abhängigen Induktion hatte ergeben, dass die Behandlung mit 50 bis 1000 ng/ml Tet zu einer maximalen Expression von HNF4 α führte, während die Behandlung mit 10 ng/ml Tet eine niedrigere HNF4 α -Expression induzierte (s. Abb. III.6A). Daher wurde das

Wachstum der Zellen mittels MTS-Test bei einer Induktion mit 10, 50 und 1000 ng/ml Tetracyclin untersucht. Die Behandlung der Zellen mit den Tet-Konzentrationen von 50 und 1000 ng/ml Tet, mit denen das gleiche Proteinniveau erreicht wurde, bewirkte die gleiche Verringerung der Proliferation. Bei der niedrigeren Tet-Konzentration von 10 ng/ml, mit der ein niedrigeres Proteinniveau erreicht wurde, war das Ausmaß der hemmenden Wirkung auf die Proliferation geringer, aber gegenüber Kontrollzellen noch immer signifikant (Abb. III.13B).

Um festzustellen, ob die morphologischen Veränderungen ebenfalls von der HNF4 α -Konzentration abhängig waren, wurde die Zellmorphologie bei den verschiedenen Tet-Konzentrationen analysiert. Mit 50 und 1000 ng/ml Tet waren die gleichen Änderungen zu beobachten, während bei 10 ng/ml Tet das Ausmaß der morphologischen Veränderungen geringer war.

Aus den Ergebnissen lässt sich folgern, dass die Wirkung von HNF4 α auf die Proliferation und auf die Zellmorphologie vom HNF4 α -Proteinniveau abhängig ist. Ein niedrigeres HNF4 α -Proteinniveau, das näher an den physiologischen Bedingungen liegt, beeinflusst ebenfalls die Zellvermehrung und die Zellmorphologie zu einem niedrigeren Ausmaß.

6 Die von HNF4 α hervorgerufenen Effekte erfolgen über die Aktivierung von HNF4 α -Zielgenen

Da HNF4 α ein Transkriptionsfaktor ist, sind die Effekte, die durch HNF4 α in HEK293 Zellen hervorgerufen werden, wahrscheinlich die Folge der Veränderung der Expression von HNF4 α -Zielgenen. Es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte durch eine Interaktion von HNF4 α mit einem anderen Protein zustande kommen, ohne dass eine Genaktivierung notwendig wäre. Hierzu stellt der zellspezifische Transkriptionsfaktor C/EBP α einen Präzedenzfall dar. C/EBP α arretiert durch direkte Interaktion mit den Cyclin-abhängigen Kinasen Cdk2 und Cdk4 die Zellproliferation, ohne dass die DNA-Bindungsdomäne dazu notwendig ist (Wang et al. 2001; Wang et al. 2002). Die identifizierten Prozesse, die durch HNF4 α ausgelöst wurden, wurden durch die HNF4 α -Mutanten R154X#6 und C106R#1 nicht hervorgerufen. Der MODY Mutante R154X fehlen die 320 C-terminalen Aminosäuren, so dass nicht ausgeschlossen werden konnte, dass diese C-terminale Proteindomäne von HNF4 α die beobachteten Effekte vermittelte. Bei der

Mutante C106R ist ein Cystein gegen ein Arginin in der Zinkfingerdomäne ausgetauscht (Taylor et al. 1996). Dieser Mutante fehlt die Fähigkeit zur DNA-Bindung, sie enthält aber die ganze Proteinsequenz. Somit stellte diese Mutante die richtige Kontrolle dar, um zu beweisen, dass die HNF4 α -Effekte nur durch DNA-Bindung und Genaktivierung und nicht durch eine Interaktion mit anderen Proteinen hervorgerufen werden.

Um sicher zu stellen, dass die Mutante C106R keinen Effekt auslöste, wurde eine zweite unabhängige Zelllinie analysiert. Die Charakterisierung der zweiten Zelllinie HNF4 α C106R #2 zeigte, dass die Induktion sehr ähnlich wie in den Zelllinien HNF4 α C106R#1 und HNF4 α wt #1 war (Abb. III. 14B). Die Expression von HNF4 α C106R in der zweiten Zelllinie hatte ebenfalls keine Wirkung auf die Proliferation (Abb. III.14C) und die Morphologie der Zellen.

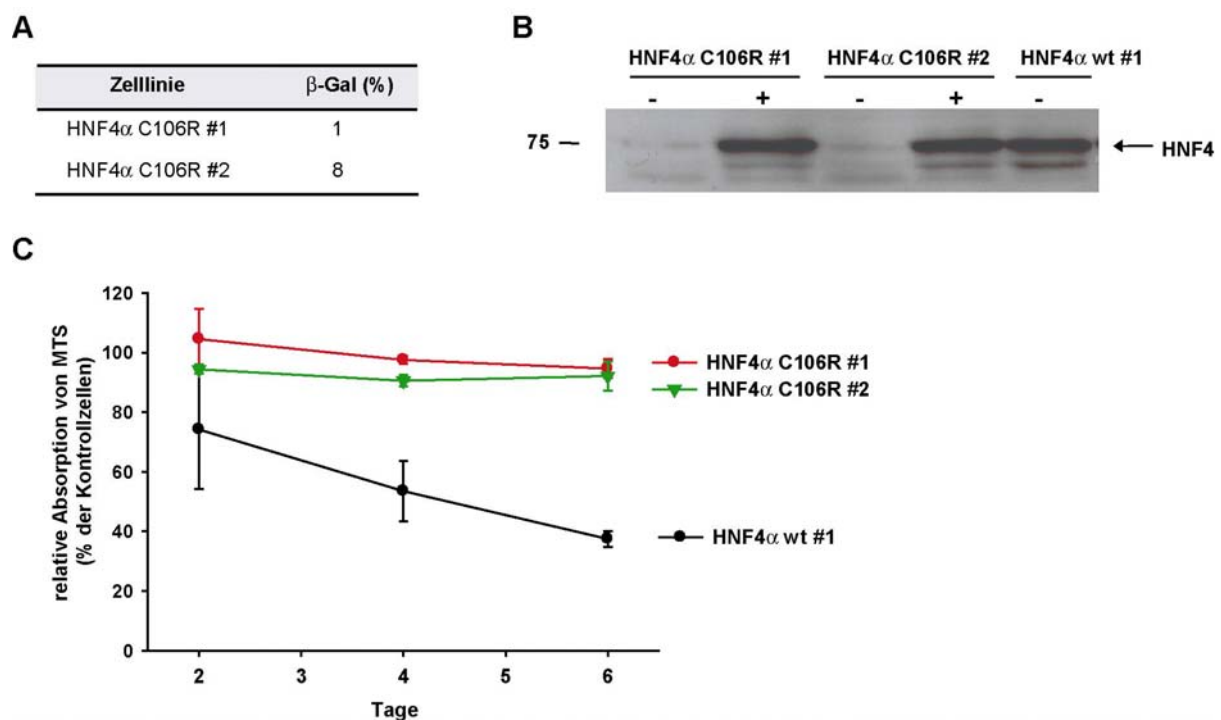


Abb. III.14: Die Expression der HNF4 α -Mutante C106R führt zu keiner Hemmung der Proliferation in den zwei unabhängigen Zelllinien C106R#1 und C106R#2. (A) β-Galaktosidase-Test der etablierten C106R-Zelllinien. Angegeben ist der Anteil β-Galaktosidase-positiver Zellen. **(B)** Analyse der Induktion durch Western Blot mit dem myc-spezifischen Antikörper 9E10. Die Zelllinien wurden ohne oder mit Tetracyclin für 24 Std. kultiviert. **(C)** Die Proliferation der Zelllinien wurde mittels MTS-Test analysiert. Die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) eines als Dreifachbestimmung angefertigten Experimentes sind jeweils in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen angegeben.

Da die Expression der HNF4 α C106R-Mutante in den zwei unabhängigen Zelllinien keine Wirkung zeigte, kann ausgeschlossen werden, dass HNF4 α dessen Wirkung durch eine Protein-Protein Interaktion auslöst. Man kann die Schlussfolgerung ziehen, dass die durch HNF4 α hervorgerufenen Effekte über die Aktivierung von HNF4 α -Zielgenen zustande kommen.

7 Identifizierung von HNF4 α -Zielgenen in HEK293 Zellen

HNF4 α beeinflusst die Proliferation und die Zellmorphologie höchstwahrscheinlich durch die Regulation der Expression von spezifischen Zielgenen. Um diese Gene zu identifizieren, wurde das Expressionsprofil in den HNF4 α -exprimierenden Zellen mittels Oligonukleotid-Mikroarrays (Genechips) untersucht. Mit der Mikroarray-Technologie ist es möglich die Expression von Tausenden von Transkripten gleichzeitig zu analysieren. Eine genaue Beschreibung der verwendeten Genechips und der Mikroarray-Technologie findet sich in Abschnitt II. 8.

Um die Gene zu ermitteln, die durch HNF4 α wt oder durch die HNF4 α -Mutanten reguliert wurden, wurden bei allen durchgeführten Mikroarray-Analysen die mit Tetracyclin induzierten Zellen (+Tet) mit den nicht behandelten Kontrollzellen (- Tet) verglichen. Für die Identifizierung der differentiell exprimierten Proben (Sondensätzen) wurden folgende Filterbedingungen eingesetzt:

- Die Proben mussten induziert (I) oder reprimiert (D) sein.
- Die Proben sollten in den induzierten Zellen mindestens eine 2,0-fache Änderungen gegenüber den entsprechenden Proben in den unbehandelten Zellen aufweisen (fold change $\geq 2,0$ bzw. signal log ratio $\geq 1,0$ für induzierte oder fold change $\leq -2,0$ bzw. signal log ratio $\leq -1,0$ für reprimierte Proben)
- In dem HG-U133A Array sollte das „change p-value“ bei $p < 0,001$ in den induzierten Proben und bei $p > 0,999$ in den reprimierten Proben liegen.
- Und weiterhin sollte mindestens in den Kontrollzellen oder in den induzierten Zellen das Transkript als vorhanden (present call) definiert worden sein.

Tab. III.1: Verwendete Filterbedingungen für die Ermittlung der differentiell exprimierten Gene in den Affymetrix Genechips HG-U95A und HG-U133A.

Filter HG-U95A	Diff Call	Fold Change	Sort Score	Inc Ratio	Dec Ratio	Avg Diff
Induziert	I	$\geq 2,0$	> 1	$> 0,5$		> 500
Reprimiert	D	$\leq -2,0$	< -1		$> 0,5$	< -500

Filter HG-U133A	Diff Call	Signal Log Ratio (Basis 2)	change p-value
Induziert	I	$\geq 1,0$	$< 0,001$
Reprimiert	D	$\leq -1,0$	$> 0,999$

Das Expressionsprofil der HNF4 α -exprimierenden Zellen sollte zu einem möglichst frühen Zeitpunkt durchgeführt werden, so dass nur direkte Zielgene erfasst würden. Als erstes wurde in Vorversuchen analysiert, welcher der frühmöglichste Zeitpunkt zur Isolierung der RNA für

den Einsatz im Mikroarray war. Dafür wurde der Affymetrix Genechip HG-U95A eingesetzt. Dieser Mikroarray beinhaltet 12.625 Proben. Da in der Analyse der zeitabhängigen Tet-Induktion festgestellt wurde, dass bereits nach dreistündiger Tet-Zugabe das HNF4 α -Protein in der Zelle translatiert wurde, wurde eine Induktionszeit von 6 Stunden ausgewählt, um die erste Mikroarray-Analyse durchzuführen. Die Zelllinie HNF4 α wt #1 wurde für 6 Stunden induziert oder unbehandelt gelassen, und die RNA wurde isoliert und im Mikroarray analysiert. Die Analyse zeigte, dass nur sehr wenige Proben (11 Proben) differentiell exprimiert wurden (s. Anhang Tab. VII.1). Deswegen wurden für den nächsten Vorversuch längere Induktionszeiten ausgewählt. Die Genexpression in der Zelllinie HNF4 α wt #1 wurde nach einer Induktion von 15, 24 und 48 Stunden untersucht. Man stellte fest, dass bereits nach 15 Std. eine hohe Anzahl von Genen reguliert waren und dass die Anzahl der Gene mit der Zeit nicht weiter signifikant zunahm (s. Anhang Tab. VII.2 und VII.3). Für die folgenden Experimente wurden deswegen die 12- und 24-stündigen Induktionszeiten ausgewählt.

Der neuere Affymetrix Genechip HG-U133A wurde für die Hauptversuche eingesetzt. Dieser Mikroarray beinhaltet 22.283 Proben, die ca. 18.400 humane Transkripte detektieren. Mit diesem Genechip wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. In einem ersten Experiment wurden die Zelllinien HNF4 α wt#1, HNF4 α wt#4 und R154X#6 für 12 und 24 Std. mit Tetracyclin behandelt und zur Kontrolle für 24 Std. mit Ethanol behandelt. Die RNA wurde isoliert, die cRNA synthetisiert, markiert und anschließend mit dem Genechip HG-U133A hybridisiert. In einem zweiten Experiment wurde die RNA der Mutante-Zelllinien C106R#1 und C106R#2 nach 24 Std. Tetracyclin und Ethanol Behandlung isoliert, und die cRNA ebenfalls mit dem Mikroarray hybridisiert.

Zelllinie	Anzahl der regulierten Proben /Gene in dem Genechip HG-U133A	
	nach 12 Std.	nach 24 Std.
HNF4 α #1	149	248
HNF4 α #4	138	275
HNF4 α #1 + HNF4 α #4	26 / 21*	78 / 66*
HNF4 α R154X #6	46	46
HNF4 α C106R #1	n.b.	34
HNF4 α C106R #2	n.b.	42
HNF4 α C106R #1 + HNF4 α C106R #2	n.b.	2 / 1

Tab. III.2: Anzahl der regulierten Proben (probe sets) und Gene in den verschiedenen Zelllinien. Da für viele Gene auf dem Genechip mehr als eine Probe vorhanden war, ist die Anzahl der regulierten Gene kleiner als die Anzahl der regulierten Proben. Die Anzahl der regulierten Gene ist kursiv dargestellt. Das HNF4 α -Gen wurde nicht mitgezählt.
*:Berücksichtigung aller Filterbedingungen + present (P)-call. n.b.:nicht bestimmt.

In der Tabelle III.2 ist die Anzahl der regulierten Proben in den verschiedenen Zelllinien aufgeführt. Man erkennt, dass in den zwei unabhängigen wt-Zelllinien eine ähnliche Anzahl von Genen differentiell exprimiert ist und dass die Anzahl der regulierten Proben in den zwei wt-Zelllinien mit der Inkubationszeit zunimmt. Es wird auch deutlich, dass in den zwei Mutanten-Zelllinien viel weniger Proben differentiell exprimiert sind als in den wt-Zelllinien.

7.1 HNF4 α -regulierte Gene

Um die Gene zu identifizieren, die spezifisch durch HNF4 α wt reguliert werden, wurden bei der Auswertung der Daten nur Gene berücksichtigt, die gleichzeitig die Filterbedingungen in beiden untersuchten wt-Zelllinien nicht aber in den Mutanten-Zelllinien R154X#6, C106R#1 und C106R#2 erfüllten.

Tabelle III.3 zeigt die 21 Transkripte, die diese Kriterien sowohl nach 12 als auch nach 24 Std. erfüllten, während in Tabelle III.4 die 65 Transkripte aufgeführt sind, die nur zum späten Zeitpunkt (24 Std.) die geforderten Bedingungen erfüllten.

Keine Veränderung wurde festgestellt, die sich auf die 12 Std. Induktion beschränkte. Alle Transkripte die nach 12 Std. reguliert waren, waren ebenfalls nach 24 Std. differentiell exprimiert.

Aus Tabellen III.3 und III.4 ist ersichtlich, dass die Veränderung in der Genexpression der meisten Gene eher gering (2- bis 4-fach) war. Nur wenige der als differentiell exprimiert identifizierten Gene unterlagen einer sehr starken Regulation durch HNF4 α . Die Mehrheit der Gene war hochreguliert. Bei allen Genen, die gleichzeitig nach 12 und 24 Std. reguliert waren, handelte es sich um induzierte Gene. Und bei den 66 Genen, die nach 24 Std. HNF4 α -Induktion differentiell exprimiert waren, waren 57 Gene induziert und nur 8 reprimiert.

Die Mehrzahl der Gene, die durch HNF4 α beeinflusst werden, sind bekannte Proteinkodierende Gene, denen teilweise spezifische Funktionen zugeschrieben worden sind. Nur etwa ein Viertel der HNF4 α -regulierten Gene hat basierend auf die Gene Ontology Datenbank keine funktionelle Zuordnung. Die identifizierten Gene sind an vielen verschiedenen Prozessen involviert. Eine hohe Anzahl von regulierten Genen ist am Metabolismus, Transport und Signaltransduktion beteiligt. Interessanterweise kodieren mehrere Gene Zelladhäsionsproteine (collagen type XXI alpha 1, plakophilin 2, desmocollin 2, chondroitin sulfate proteoglycan 2) oder Komponenten des Zytoskeletts (villin 1, syndecan 4, LIM and SH3 protein 1, neurofilament light polypeptide). Die Aktivität dieser Gene könnte zu den beobachteten Veränderungen der Zellmorphologie beitragen. Unter der Annahme, dass HNF4 α ein potentieller Tumorsuppressor in der Niere sein könnte (Sel et al. 1996), ist die

Regulation des Wilms Tumor 1 Proteins (WT1) durch HNF4 α bemerkenswert, da WT1 ein Tumorsuppressor ist, der die Proliferation beeinflusst (Lee and Haber 2001).

Tab. III.3: Gentranskripte, die nach 12 und 24 Std. HNF4 α Induktion im Mikroarray reguliert waren.

Probe set HG-U133A (Affymetrix)	Gensymb	Genname	Mikroarray			
			12 Std. wt#1	24 Std. wt#4	12 Std. wt#1	24 Std. wt#4
208429_x_at / 216889_s_at	HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	17,9	15,9	50,9	34,7
Metabolismus						
214909_s_at / 215537_x_at/	DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	4,2	7,1	2,6	3,6
221760_at	MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	2,6	3,2	2,6	3,4
203608_at	ALDH5A	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	2,3	3,2	2,2	2,7
Transport						
207819_s_at	ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	6,8	10,3	24,1	21,3
222071_s_a	SLCO4C1	solute carrier organic anion transporter family, member 4C1	3,3	6,1	3,6	4,6
209994_s_at	ABCB1/// ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 / ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	3,1	4,6	3,8	3,7
209993_at	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	2,6	3,4	2,9	3,5
Signaltransduktion						
206618_at	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	2,9	3,3	2,3	3,2
Zelladhäsion						
208096_s_at	COL21A1	collagen, type XXI, alpha 1	3,6	5,0	2,2	3,4
Regulation der Transkription						
218546_at	FLJ14146	hypothetical protein FLJ14146	3,2	3,3	4,6	6,1
206067_s_at	WT1	Wilms tumor 1	4,3	3,9	4,4	4,2
Apoptose						
209939_x_at	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	2,1	2,7	3,2	2,4
Selen-bindende Proteine und Selenoproteine						
201427_s_at	SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	2,5	3,6	3,6	4,6
214433_s_at	SELENB	selenium binding protein 1	2,9	5,0	3,4	9,2
Unbekannte Funktion						
221008_s_at	AGXT2L	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	5,4	8,6	17,9	11,4
213050_at	COBL	cordon-bleu homolog (mouse)	13,0	15,2	3,5	2,9
220441_at	FLJ13236	hypothetical protein FLJ13236	8,2	7,4	3,7	4,9
209679_s_at	LOC5722	hypothetical protein from clone 643	4,1	5,1	3,6	4,3
209343_at	EFHD1	EF hand domain containing 1	3,0	3,6	3,4	4,6
202289_s_at	TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	2,3	3,0	3,2	2,9
204565_at	THEM2	thioesterase superfamily member 2	2,7	3,9	2,2	2,5
210625_s_at / 201674_s_at	AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1	2,4	2,7	2,2	2,3

Die Gene, die gleichzeitig in den zwei unabhängigen HNF4 α Zelllinien wt#1 und wt#4 nach 12 und 24 Std. reguliert waren, sind aufgelistet. Die Gene HNF4A, DDAH2 und AKAP1 wurden mit zwei Proben detektiert. Der Mittelwert der Signale der beiden Proben ist angegeben. Die Probe 209994_s_at detektiert gleichzeitig die Gene ABCB1 und ABCB4. Die Gene sind nach ihrer Funktion gemäß der Gene Ontology Datenbank geordnet.

Tab. III.4: Gentranskripte, die nach 24 Std. HNF4 α Induktion im Mikroarray in beiden HNF4 α wt-Zelllinien reguliert waren.

Probe set HG-U133A (Affymetrix)	Gensymbol	Genname	Mikroarray	
			HNF4 α wt#1	HNF4 α wt#4
208429_x_at / 216889_s_at	HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	15,9	34,7
Metabolismus				
202262_x_at / 214909_s_at / 215537_x_at	DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	7,9	4,2
57540_at	RBSK	ribokinase	3,6	7,8
213279_at	DHRS1	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 1	4,2	4,4
208116_s_at / 221760_at	MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	3,0	3,7
203608_at	ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	3,3	2,7
200710_at	ACADVL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	3,0	2,7
209627_s_at	OSBPL3	oxysterol binding protein-like 3	2,9	2,6
213501_at	ACOX1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	2,5	2,5
205530_at	ETFDH	electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase	2,7	2,1
202740_at	ACY1	aminoacylase 1	2,3	2,4
218102_at	DERA	2-deoxyribose-5-phosphate aldolase homolog (C. elegans)	2,6	2,0
Transport				
207819_s_at	ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	10,3	21,3
222071_s_at	SLCO4C1	solute carrier organic anion transporter family, member 4C1	6,1	4,6
209994_s_at	ABCB1 /// ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1 / ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	4,6	3,7
209993_at	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	3,4	3,5
203658_at	SLC25A20	solute carrier family 25 , member 20	2,1	3,5
209712_at	SLC35D1	solute carrier family 35 , member D1	2,5	2,4
202735_at	EBP	emopamil binding protein (sterol isomerase)	2,4	2,2
204624_at	ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide (Wilson disease)	2,0	2,0
203196_at	ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	0,48	0,39
Signaltransduktion				
36920_at	MTM1	myotubularin 1	8,5	3,0
202454_s_at	ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	2,5	4,2
206618_at	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	3,3	3,2
202962_at	KIF13B	kinesin family member 13B	2,1	2,7
204168_at	MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	2,5	2,3
202732_at	PKIG	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor gamma	2,5	2,2
202974_at	MPP1	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	2,3	2,1
201887_at	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	2,1	2,3
214080_x_at	PRKCSH	protein kinase C substrate 80K-H	2,3	2,1
213880_at	LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	0,18	0,32
Zelladhäsion				
208096_s_at	COL21A1	collagen, type XXI, alpha 1	5,0	3,4
207717_s_at	PKP2	plakophilin 2	3,3	3,3
204751_x_at	DSC2	desmocollin 2	3,4	2,7
215646_s_at	CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	0,12	0,37
Zytoskelettproteine				
205506_at	VIL1	villin 1	125,4	61,0
213847_at	PRPH	peripherin	32,7	3,2
202071_at	SDC4	syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	2,3	2,8
200618_at	LASP1	LIM and SH3 protein 1	2,0	2,8
221916_at	NEFL	neurofilament, light polypeptide 68kDa	0,33	0,47
Regulation der Transkription				
218546_at	FLJ14146	hypothetical protein FLJ14146	3,3	6,2
206067_s_at	WT1	Wilms tumor 1	3,9	4,2

44783_s_at	HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	0,35	0,35
Apoptose				
221188_s_at	CIDEB	cell death-inducing DFFA-like effector b	4,4	8,5
202871_at	TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	2,6	2,7
209939_x_at	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	2,5	2,5
202076_at	BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	2,2	2,2
Selen-bindende Proteine und Selenoproteine				
214433_s_at	SELENBP1	selenium binding protein 1	5,0	9,2
201427_s_at	SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	3,6	4,6
Zellproliferation				
204457_s_at	GAS1	growth arrest-specific 1	0,39	0,49
Unbekannte Funktion				
221008_s_at	AGXT2L1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	8,6	11,4
213050_at	COBL	cordon-bleu homolog (mouse)	15,2	2,9
214342_at /	ATXN7L1 ///	ataxin 7-like 1 /// ataxin 7-like 4	7,4	5,3
214343_s_at	ATXN7L4			
220441_at	FLJ13236	hypothetical protein FLJ13236	7,4	4,9
209679_s_at	LOC57228	hypothetical protein from clone 643	5,1	4,3
64408_s_at /	CALML4	calmodulin-like 4	2,9	4,8
221879_at				
204565_at	THEM2	thioesterase superfamily member 2	3,9	2,5
202289_s_at	TACC2	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	3,0	2,9
218183_at	C16orf5	chromosome 16 open reading frame 5	2,5	2,7
212252_at	CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	2,0	2,9
210625_s_at /	AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1	2,6	2,3
201674_s_at /				
201675_at				
208336_s_at	GPSN2	glycoprotein, synaptic 2	2,6	2,3
202008_s_at	NID	nidogen (enactin)	2,3	2,2
203333_at	KIFAP3	kinesin-associated protein 3	2,1	2,1
203245_s_at	FLJ35348	FLJ35348	0,35	0,29
209859_at	TRIM9	tripartite motif-containing 9	0,23	0,35

Die hochregulierten ($\geq 2,0$ -fach, $p < 0,001$) und herunterregulierten Gene ($\leq 0,5$ -fach, $p > 0,999$) in den zwei HNF4 α Zelllinien wt#1 und wt#4 nach 24 Std. Induktion sind aufgelistet. Die Gene HNF4A, MANA1, ABCB1, CFLAR, ATXN7L1 und CALML4 wurden mit zwei Proben und die Gene DDAH2 und AKAP1 mit drei Proben detektiert. Für diese Gene ist der Mittelwert der Signale der unterschiedlichen Proben angegeben. Die Gene sind nach ihrer Funktion gemäß der Gene Ontology Datenbank geordnet. Alle Mikroarray-Ergebnisse sind in GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) eingereicht.

7.2 HNF4 α R154X- und HNF4 α C106R-regulierte Gene

Die Genexpression wurde ebenfalls in den Mutanten-Zelllinien untersucht, um aus den HNF4 α wt-Zielgenen Kandidatengene für die HNF4 α -Effekte auszuschließen.

Nur ein Gen, LOC492304, wurde in der Zelllinie HNF4 α R154X#6 gleichzeitig nach 12 und 24 Std. reguliert (Tab. III.5).

Tab. III.5: Gentranskripte, die nach 12 und 24 Std. Induktion in der HNF4 α R154X#6 Zelllinie verändert waren.

Probe set	Gensymbol	Genname	Mikroarray	
			R154X #6 12h	R154X #6 24h
208429_x_at	HNF4	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	7,5	4,9
Wachstumsfaktor Aktivität				
202409_at	LOC492304	putative insulin-like growth factor II associated protein	0,26	0,36

Und nur ein Gen, DDX17 (DEAD box polypeptide 17), wurde gleichzeitig in den zwei untersuchten Zelllinien HNF4 α C106R#1 und HNF4 α C106R#2 nach 24 Std. reguliert (Tab. III.6).

Tab. III.6: Gentranskripte, die nach 24 Std. Induktion in den HNF4 α C106R #1 und #2 Zelllinien verändert waren.

Probe set	Gensymbol	Genname	Mikroarray	
			C106R #1	C106R #2
216889_s_at	HNF4	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	11,9	30,3
208429_x_at	HNF4	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	13,6	16,9
RNA- Prozessierung				
208719_s_at	DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	3,5	2,6
213998_s_at	DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	2,5	2,7

Die Expression der HNF4 α -Mutanten führt zu keiner Änderung der Proliferation oder der Zellmorphologie, so dass die Gene, die durch die Überexpression dieser Proteine reguliert werden, nicht für die beobachteten HNF4 α -Effekte zuständig sein können. Es gab jedoch keine Übereinstimmung in den regulierten Genen zwischen den Mutanten- und wt-Zelllinien, so dass die Ermittlung der Zielgene der Mutanten zu keiner Reduktion der Anzahl der Kandidatengene für die HNF4 α -Effekte führte.

8 Validierung ausgewählter Kandidatengene

Die Ergebnisse des Expressionsvergleichs mittels Mikroarray-Analyse geben einen ersten Hinweis auf durch HNF4 α regulierte Gene in den untersuchten HEK293 Zellen. Um sicher zu stellen, dass die Gene differentiell exprimiert sind, muss eine Validierung der Ergebnisse durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Bestätigung der Ergebnisse auf RNA-Ebene durch Real-time PCR und auf Proteinebene durch Western Blot. Die Regulation der 6 ausgewählten Kandidatengene WT1, VIL1, DSC2, MTM1, SEPP1 und SELENBP1 (s. III.11) wurde zunächst mittels quantitativer Real-time PCR überprüft.

8.1 Validierung mittels Real-time PCR

8.1.1 SYBRGreen und TaqMan-Sonden

Die Induktion der HNF4 α -Zielgene wurde zunächst mittels Real-time PCR mit SYBRGreen und TaqMan-Sonden analysiert (s. II. 9.3). Die gleiche RNA, die bei der Mikroarray-Analyse verwendet wurde, wurde dafür eingesetzt. Die Menge der Transkripte wurde nach 12 und 24 Std. Induktion (+Tet) und nach 24 Std. Ethanol Behandlung (-Tet) in den Zelllinien HNF4 α wt#1, HNF4 α wt#4 und HNF4 α R154X#6 bestimmt.

Zunächst wurden die Gene VIL1 und SEPP1 mittels Real-time PCR mit SYBRGreen untersucht. Abbildung III.15 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

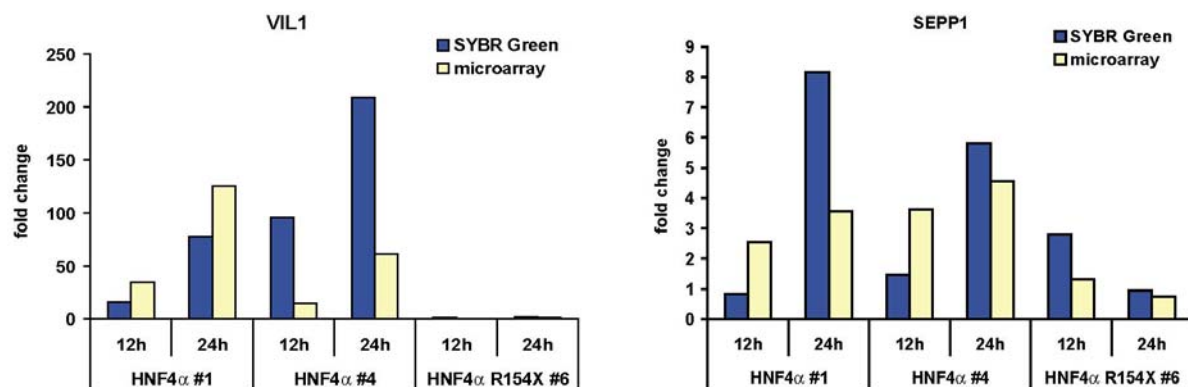


Abb. III.15: Validierung der Kandidatengene Villin 1 (VIL1) und Selenoprotein P (SEPP1) mittels SYBRGreen Real-time PCR. Zur Normalisierung wurde das Referenzgen GAPDH verwendet. Die relative Transkriptmenge der induzierten Zellen (+Tet) im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen (-Tet) ist als fold change angegeben. Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Zum Vergleich werden auch die ermittelten Induktionswerte aus der Mikroarray-Analyse gezeigt.

Für das VIL1 Transkript konnte die starke Induktion bestätigt werden. Die große Abweichung in den ermittelten Werten mittels Real-time PCR und Mikroarray beruht darauf, dass in den nicht induzierten Zellen in beiden Methoden die VIL1-mRNA nicht detektierbar ist. Somit kann das Ausmaß der Induktion nicht genau gemessen werden.

Für SEPP1 konnte die Induktion nur nach 24 Std. bestätigt werden. Nach 12 Std. lag die Induktion in den zwei wt-Zelllinien unter 2,0 und war geringer als in der Kontrolle (R154X#6).

Die Regulation der Gene WT1, DSC2, MTM1 und SELENBP1 wurde mittels Real-time PCR mit TaqMan-Sonden (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems) untersucht.

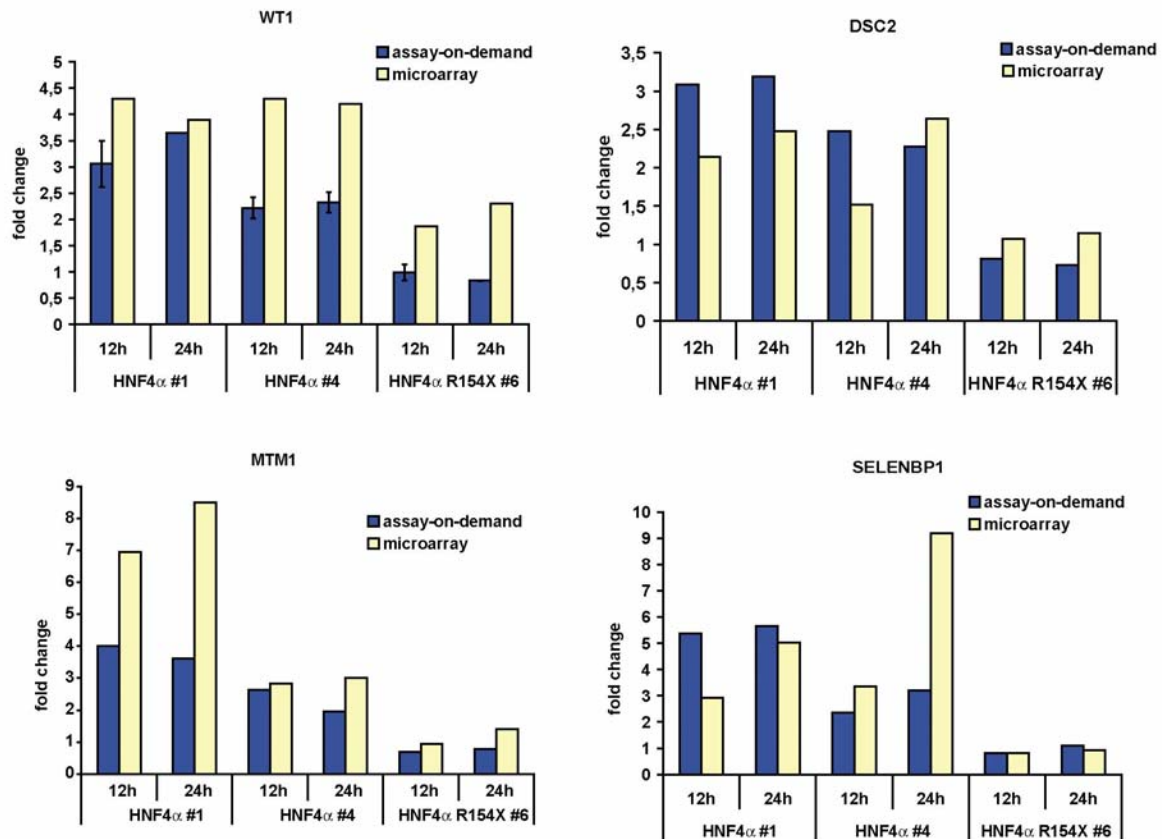


Abb. III.16: Validierung der Kandidatengene WT1, DSC2, MTM1 und SELENBP1 mittels Real-time PCR mit TaqMan-Sonden (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems). Zur Normalisierung wurde das Referenzgen 18sRNA verwendet. Die relative Transkriptmenge der induzierten Zellen (+ Tet) im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen (-Tet) ist als fold change angegeben. Die Ergebnisse für DSC2, MTM1 und SELENBP1 zeigen die Mittelwerte eines als Dreifachbestimmung angefertigten Experimentes. Die Ergebnisse für WT1 zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten, die in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Zum Vergleich werden auch die ermittelten Induktionswerte aus der Mikroarray-Analyse gezeigt.

Die Induktion aller vier Gene konnte verifiziert werden, wobei aber gewisse Unterschiede zwischen den ermittelten Werten in der Real-time PCR und Mikroarray-Analyse bestanden (Abb. III.16). Allgemein war die durch die Real-time PCR gemessene Induktion etwas geringer als in der Mikroarray-Analyse. Die Tendenzen stimmten aber durchweg überein. In den induzierten HNF4 α wt-Zelllinien zeigten die Transkripte mehr als eine 2,0-fache Änderung gegenüber den Kontrollzellen, während bei der HNF4 α R154X#6-Zelllinie keine Induktion der Transkripte festgestellt wurde. Somit konnte die Induktion der 6 ausgewählten Kandidatengene WT1, VIL1, DSC2, MTM1, SEPP1 und SELENBP1 durch Real-time PCR bestätigt werden.

8.1.2 TaqMan Low Density Array

Um eine höhere Anzahl von potentiell durch HNF4 α regulierten Genen zu validieren, wurde eine Real-time PCR Analyse mit dem TaqMan Low Density Array von Applied Biosystems durchgeführt. Im Abschnitt II.9.3 wird diese Real-time PCR-Technologie im Array-Format beschrieben. In der ausgewählten Konfiguration des Arrays wurden mit 96 TaqMan Gene Expression Assays (TaqMan-Sonde + Primer) 82 Gene analysiert.

Für die Validierung wurden aus den 65 nach 24 Stunden regulierten Genen (Tab. III.4) 51 Gene ausgewählt, für die TaqMan Gene Expression Assays verfügbar waren. Zusätzlich wurden noch 34 Gene ausgesucht, die die Filterbedingungen bei der Auswertung der Mikroarray-Daten nicht erfüllt hatten. Ein Teil dieser Gene zeigte in dem Mikroarray einen fold change-Wert kleiner als 2,0, stand aber mit der Proliferation oder Zellmorphologie im Zusammenhang. Ein anderer Teil der Gene hatte die Filterbedingungen in dem Mikroarray-Vorversuch mit dem HG-U95A Genechip erfüllt, nicht aber in der Mikroarray-Analyse mit dem HG-U133A Genechip. Zusätzlich waren auf der Karte zwei Gene, die den „present-call“-Filter nicht erfüllt hatten, und zwei Gene, die mit einer anderen Auswertungsmethode zur Berechnung der Signale ermittelt wurden (Tab. III.7 und Tab. VII.4).

Tab. III.7: Gene auf dem TaqMan[®] Low Density Array.

Gene auf dem TaqMan Low Density Array	Anzahl der Gene	Anzahl der validierten Gene
alle Gene	82	69
Mikroarray HG-U133A, fold change $\geq 2,0$	51	46
Mikroarray HG-U133A, fold change $< 2,0$	14	13
Mikroarray HG-U133A, present-call Filter nicht erfüllt	2	2
Mikroarray HG-U95A, fold change $\geq 2,0$	12	7
aus einer anderen Auswertungsmethode	2	0

In der Tabelle VII.4 im Anhang sind die einzelnen Gene aufgeführt.

Die Genexpression wurde in den Zelllinien HNF4 α wt#1 und HNF4 α wt#4 sowie in der Mutanten-Zelllinie HNF4 α C106R#1 nach 24 Stunden Tetracyclin-Induktion (+Tet) und in den entsprechenden nicht behandelten Zellen analysiert (-Tet). Für die Messung wurden zwei RNA-Präparationen eingesetzt: die gleiche RNA wie bei der Mikroarray-Analyse und eine RNA aus einem unabhängigen Experiment.

Die ermittelten Daten wurden mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet (s. II.9.4). Die Transkriptmenge in den Tet-behandelten Zellen wurde mit der Transkriptmenge in den Kontrollzellen (-Tet) verglichen. In der Tabelle VII.5 (Anhang) sind die Ergebnisse der zwei unabhängigen RNA-Präparationen aufgelistet.

Für 69 von den 82 untersuchten Genen (84%) wurde das Ergebnis der Mikroarray-Analyse bestätigt. Diese 69 Gene waren in den wt-Zelllinien reguliert und zeigten keine Regulation in der Mutante-Zelllinie.

Bei zwei von den 13 nicht bestätigten Genen wurde in der Zwischenzeit von Affymetrix die Bezeichnung geändert (CLN6 und NPR2L). Somit wurden für diese zwei durch Mikroarray-Analyse identifizierte Transkripte das falsche Gen in der Real-time PCR analysiert.

Beim Vergleich der ermittelten Induktionen mittels Real-time PCR und Mikroarray-Analyse wird deutlich, dass das Ausmaß der Aktivierung im Mikroarray mit der Induktion in der Real-time PCR Untersuchung korrelierte (Abb. III.18). Man erkennt, dass die Mehrheit der Gene eine geringfügig stärkere Regulation in der Real-time PCR-Analyse aufwies. Nur die Gene mit hohen Induktionswerten im Mikroarray und die herunterregulierten Gene wiesen in der Real-time PCR geringere Induktionen als in der Mikroarray-Analyse auf.

Aus der Real-time PCR Analyse lässt sich schlussfolgern, dass die Mehrheit der analysierten Gene validiert werden konnten. Diese hohe Validierung bekräftigt die Signifikanz der erhaltenen Mikroarray-Daten.

8.2 Validierung mittels Western Blot

Um eine Validierung ebenfalls auf Proteinebene durchzuführen, wurde die Induktion der Gene Wilms tumor 1 (WT1) und Villin 1 (VIL1) mittels Western Blot analysiert. Diese zwei Gene wurden ausgewählt, weil beide gute Kandidaten für die Vermittlung der HNF4 α -Effekte darstellen (s. III.11). Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wurde das Proteinniveau von WT1 und VIL1 nach 24 Std. HNF4 α -Induktion im Western Blot untersucht. Für beide Gene wurde eine signifikante Zunahme auf Proteinniveau in HNF4 α exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet.

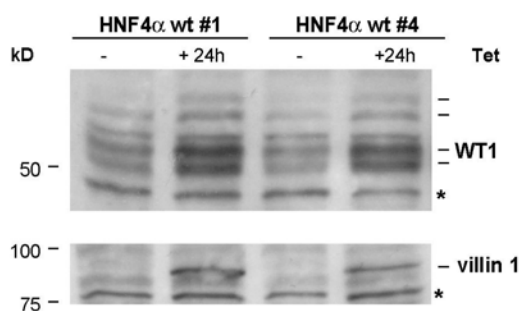


Abb. III.17: Validierung der Kandidatengene WT1 und VIL1 mittels Western Blot. Die Zelllinien HNF4 α wt#1 und HNF4 α wt#4 wurden für 24 Std. mit Tet induziert oder uninduziert gelassen. 20 μ g Gesamtproteinextrakt wurden auf das Gel aufgetragen. Die Western Blots wurden mit WT1-spezifischen Antikörper (WT, C-19, Santa Cruz) und Villin-spezifischen Antikörper (Villin, 210358, BD) durchgeführt. Die unspezifischen Banden (*) dienen als Ladekontrolle.

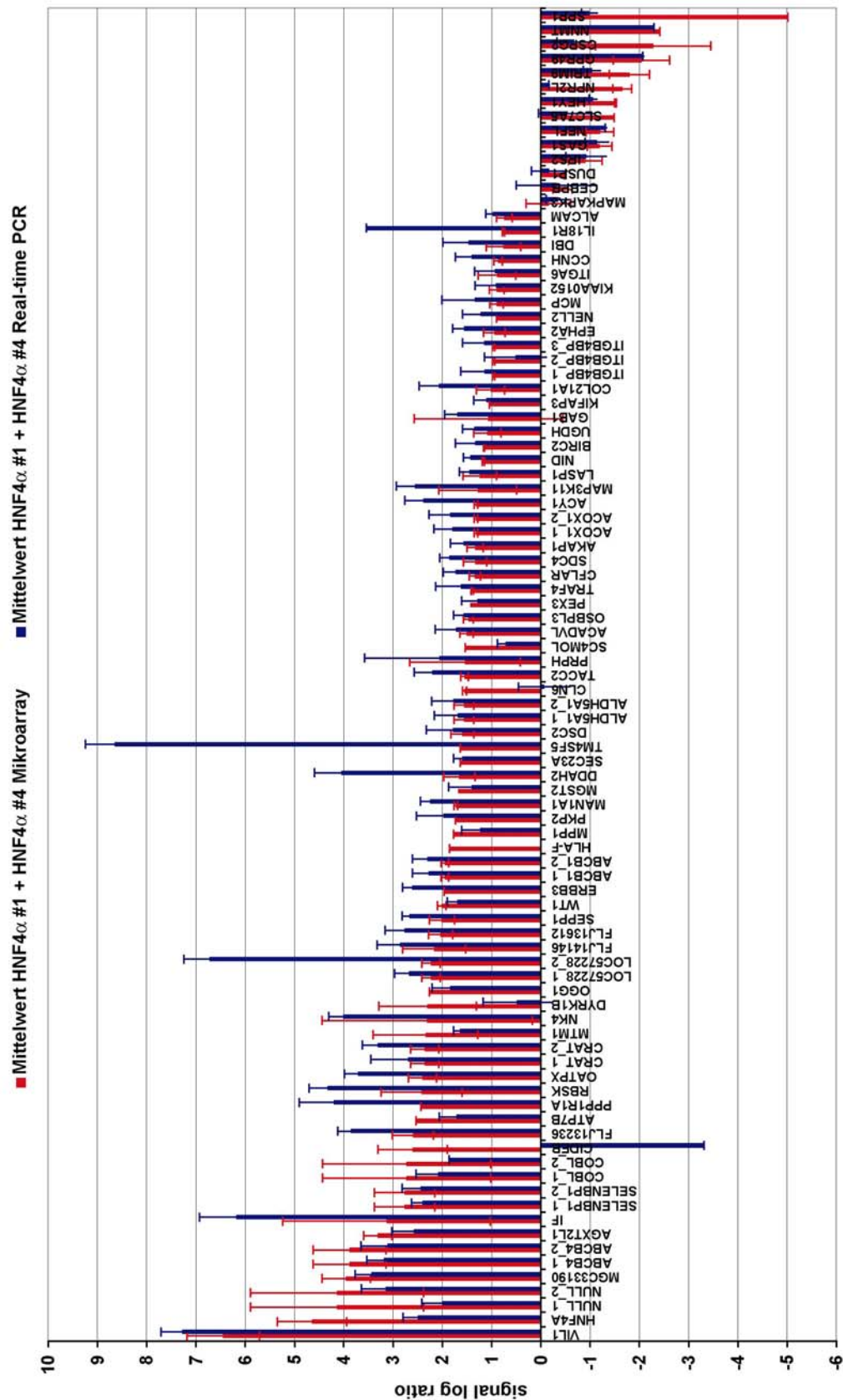


Abb. III.18: Vergleich der ermittelten Induktionen in der Real-time PCR mit TaqMan Low Density Array (Applied Biosystems) und in der Mikroarray-Analyse (Affymetrix). Der Mittelwert der Induktionen in den Zelllinien HNF4α wt#1 und HNF4α wt#4 ist angegeben. Die relative Transkriptmenge ist als Signal Log Ratio (Basis 2) angegeben.

9 Analyse der gewebespezifischen Genexpression der identifizierten HNF4 α -Zielgene

Um zu analysieren, in welchen humanen Geweben die identifizierten HNF4 α -Zielgene exprimiert werden, wurde eine statistische Auswertung durchgeführt. Diese Auswertung ist vor kurzem von Lim et al beschrieben worden (Lim et al. 2005) und basiert auf der Zuteilung von einer Rangordnung hinsichtlich der gewebespezifischen Genexpression für die analysierten Gene. Die Genexpressionsprofile von 33 humanen Geweben, die ebenfalls mit dem Affymetrix Genechip HG-U133A generiert wurden, wurden für die Auswertung eingesetzt. Durch die Einordnung des Expressionsniveaus von jedem Gen in allen Geweben wurde ein Index der relativen Genexpression für die 33 Gewebearten generiert. Die Abbildung III.19A zeigt ein Histogramm der Expression aller Gene des Affymetrix Genechips in der Niere. Der Balken, der am weitesten links steht (Rang 1), repräsentiert die Anzahl der Gene, die am höchsten in der Niere im Vergleich zu den anderen Geweben exprimiert wird. Der Balken, der am weitesten rechts steht (Rang 33), repräsentiert die Gene, die in der Niere weniger als in allen anderen Geweben exprimiert werden. Die Abbildung III.19B zeigt das Histogramm der Expression der durch HNF4 α -hochregulierten Gene in der Niere. Die Rangverteilung der Gene, die durch HNF4 α hochreguliert werden, unterscheidet sich von der Verteilung der gesamten Reihe von Genen des Genechips durch eine bevorzugte Anreicherung der Gene, die im hohen Niveau in der Niere exprimiert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine hohe Anzahl von HNF4 α -induzierten Genen hauptsächlich in der Niere exprimiert wird.

Die statistische Analyse wurde für die 33 analysierten Gewebe durchgeführt. Eine signifikante Zunahme der Ränge wurde zusätzlich in der Leber, Lunge, Pankreas und fetalen Leber beobachtet (Abb. III.19C). Somit kodieren die Gene, die durch HNF4 α in HEK293 Zellen hochreguliert werden, überwiegend Transkripte, die in der Niere, Leber, Pankreas und Lunge exprimiert werden. Bei der Niere, Leber und Pankreas handelt es sich um Gewebe, wo der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α exprimiert wird. Eine Ausnahme stellt die Lunge dar, wo keine HNF4 α -Expression detektiert wurde (Drewes et al. 1996). Der Magen und der Darm, die auch eine hohe Expression des HNF4 α -Gens aufweisen, konnten nicht analysiert werden, weil für diese Gewebe keine Mikroarray-Ergebnisse verfügbar waren.

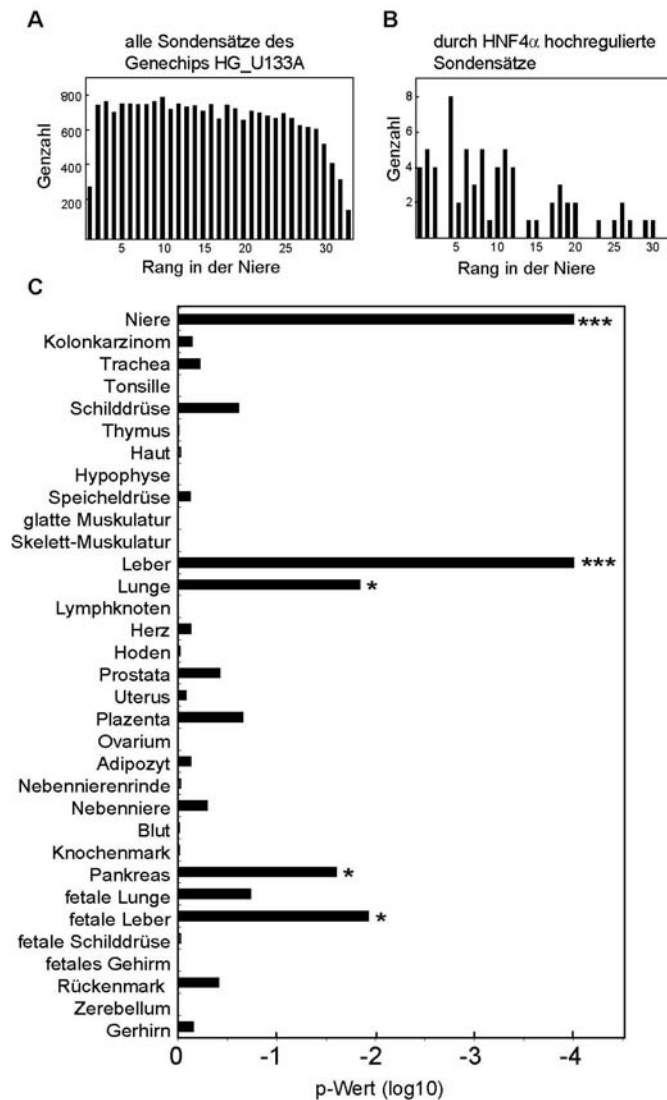


Abb.III.19: Die durch HNF4 α hochregulierten Gene werden hauptsächlich in der Niere, Leber, Pankreas und Lunge exprimiert. (A) Rangordnungen in der Niere für 21.879 Sondensätze. Die Expressionsniveaus jedes Sondensatzes des Genechip HG-U133A wurden anhand des Ranges in einer Sammlung von 33 humanen Geweben sortiert. Die Genexpressionsprofile der humanen Geweben wurden aus der Datenbank GDS596 (NCBI's Gene Expression Omnibus Datenbank) ausgewählt. Die Sondensätze, die ein Mittelwertsignal kleiner als 100 in allen Geweben zeigten, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die restlichen Signalwerte, die kleiner als 100 waren, wurden zu 100 abgeglichen, bevor die Ränge zugeteilt wurden. (B) Rangordnungen in der Niere für die 66 Sondensätze, die die 57 Gene entsprechen, die durch HNF4 α in HEK293 Zellen hochreguliert waren. Die Ränge wurden wie unter (A) beschrieben ermittelt. (C) Die Rangordnung der HNF4 α -Zielgene in jedem Gewebe wurde mit den entsprechenden Hintergrund-Rangordnungen mittels eines einseitigen Mann-Whitney Tests verglichen. Die p-Werte als log (Basis 10) sind für die 33 Gewebe aufgetragen. *** und * weisen jeweils auf p-Werte <0,0001 und <0,05 hin. Bei dem Kolonkarzinom handelt es sich um ein kolorektales Adenokarzinom. Bei allen anderen Geweben handelt es sich um gesunde Proben.

10 Mehrere Gene, die durch HNF4 α in HEK293 Zellen reguliert werden, sind im Nierenzellkarzinom (NZK) dereguliert

Im Nierenzellkarzinom ist die HNF4 α -Expression sowohl auf mRNA- (Lenburg et al. 2003) als auch auf Protein-Ebene (Sel et al. 1996) in dem Tumorgewebe im Vergleich zu dem normalen Nierengewebe reduziert. Die Reduktion der HNF4 α -Expression im NZK sollte zu einer Deregulation von HNF4 α -regulierten Genen führen. Um diese Annahme zu prüfen, wurden die HNF4 α -regulierten Gene in HEK293 Zellen mit den Genen, die im NZK differentiell exprimiert sind, verglichen. Für die Vergleichsanalyse wurden die 1234 Gene, die mehr als 3,0-fach in der Mikroarray-Studie des NZK verändert sind (Lenburg et al. 2003), eingesetzt. Diese Gene wurden mit den 65 Genen verglichen, die nach 24 Std. HNF4 α -Induktion in HEK293 Zellen als differentiell exprimiert identifiziert wurden (s. Tab. III.4). 15

von den 65 HNF4 α -regulierten Genen wurden im NZK differentiell exprimiert (Tab. III.8). Interessanterweise sind 13 von diesen 15 Genen in NZK genau in der umgekehrten Richtung wie in HEK293 Zellen reguliert. Solche Regulation wird für HNF4 α -Zielgene erwartet, da HNF4 α in NZK herunterreguliert ist.

Tab. III.8: HNF4 α -regulierte Gene, die im Nierenzellkarzinom (NZK) dereguliert sind.

Probe set (Affymetrix)	Gensymbol	Genname	Veränderung (fold change)		
			Mikroarray		Real-time
			NZK	HEK293	HEK293
	HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	0.21	25.27	5.65
Gene herunterreguliert im NZK, hochreguliert nach HNF4α-Induktion					
202740_at	ACY1	aminoacylase 1	0.06	2.3	4.7
206067_s_at	WT1	Wilms tumor 1	0.10	4.0	3.2
214433_s_at	SELENBP1	selenium binding protein 1	0.22	7.1	5.0
213050_at	COBL	cordon-bleu homolog (mouse)	0.22	9.1	3.9
209343_at	EFHD1	EF hand domain containing 1	0.23	4.1	6.5
221008_s_at	AGXT2L1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	0.24	10.0	5.6
203608_at	ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	0.24	3.0	3.2
204565_at	THEM2	thioesterase superfamily member 2	0.31	3.2	n.b.
209994_s_at	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B, member 1	0.32	3.8	4.8
218546_at	FLJ14146	hypothetical protein FLJ14146	0.32	4.7	7.0
Gene hochreguliert im NZK, herunterreguliert nach-HNF4α Induktion					
215646_s_at	CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	9.2	0.24	0.55
209859_at	TRIM9	tripartite motif-containing 9	7.2	0.29	0.48
44783_s_at	HEY1	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	3.1	0.35	0.47
Gene reguliert im NZK und durch HNF4α in der gleichen Richtung					
204457_s_at	GAS1	growth arrest-specific 1	0.18	0.44	0.47
208096_s_at	COL21A1	collagen, type XXI, alpha 1	7.3	4.2	4.2

Die Mikroarray-Werte für das NZK stammen aus der Lenburg et al Studie (Lenburg et al. 2003). Die angegebenen Werte für die Induktion in den HEK293 Zellen sind die Mittelwerte der zwei Zelllinien HNF4 α wt#1 und wt#4. Die „probe sets“ (Sondensätze) aus dem HG-U133A Affymetrix Genechip, die im NZK- und in den HNF4 α -exprimierenden HEK293 Zellen differentiell reguliert sind, sind angegeben. Nur das probe set für HNF4 α im NZK befindet sich im HG-U133B Genechip (230914_at), da das HNF4 α probe set in dem HG-U133A Genechip das Transkript als nicht vorhanden („absent call“) definiert. n.b: nicht bestimmt; Gene, die in der Real-time PCR Analyse nicht untersucht wurden.

Die Übereinstimmung und die Regulation in der zu erwartenden Richtung deuten darauf hin, dass die 13 Gene potentielle Zielgene von HNF4 α in Nierenzellen darstellen, die aufgrund der reduzierten HNF4 α -Expression im NZK dereguliert werden. Die Herunterregulation der 10 Gene ACY1, WT1, SELENBP1, COBL, EFHD1, AGXT2L1, ALDH5A1, THEM2, ABCB1 und FLJ14146 im NZK könnte eine Konsequenz der Abnahme des HNF4 α -Niveaus sein. Es ist auch möglich, dass CSPG2, TRIM9 und HEY1 im NZK hochreguliert sind, weil diese HNF4 α -Zielgene darstellen, die anhand der Mikroarray-Ergebnissen in HEK293 Zellen durch HNF4 α herunterreguliert werden.

11 Kandidatengene für die Vermittlung der HNF4 α -Effekte

Aus der Liste der 65 Gene, die nach 24 Stunden HNF4 α -Induktion reguliert sind, wurden 6 Gene als Kandidatengene für die Vermittlung der HNF4 α -Effekte ausgewählt. Dabei wurde bei der Auswahl die Funktion der Gene berücksichtigt. Gene wurden ausgesucht, die mit der Proliferation oder der Zellmorphologie in Zusammenhang stehen und somit für die HNF4 α -Effekte verantwortlich sein könnten. Die Gene WT1, VIL1, DSC2, MTM1, SEPP1 und SELENBP1 wurden ausgewählt (Tab. III.9). Im Folgenden wird erklärt, warum diese Gene als Kandidaten für die Veränderungen der Morphologie und der Proliferation ausgesucht wurden.

Tab. III.9: Ausgewählte HNF4 α -Zielgene als Kandidaten für die Vermittlung der HNF4 α -Effekte.

Gensymbol	Genname	Mikroarray (fold change)				Funktion
		wt#1		wt#		
		12h	24h	12h	24h	
WT1	Wilms tumor 1	4,3	3,9	4,4	4,2	Regulation der Transkription
VIL1	villin 1		125,4		61,0	Zytoskelettprotein
DSC2	desmocollin 2		3,4		2,7	Zelladhäsion
MTM1	myotubularin 1		8,5		3,0	Signaltransduktion
SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	2,5	3,6	3,6	4,6	Selenoprotein
SELENBP1	selenium binding protein 1	2,9	5,0	3,4	9,2	Selen-bindendes Protein

Das Wilms tumor 1 Protein (WT1) ist ein zellspezifischer Transkriptionsfaktor, der für die Ausbildung des Genitaltraktes und der Niere eine wichtige Rolle spielt (Lee and Haber 2001). Darüber hinaus ist WT1 ein Tumorsuppressor, der die Proliferation beeinflusst (Rauscher, III 1993). Aus diesem Grund stellt WT1 ein interessanter Kandidat für die durch HNF4 α ausgelöste Hemmung der Proliferation dar.

VIL1 (Villin 1) ist ein Aktin-bindendes Protein und die Hauptkomponente der Mikrovilli in Darmepithelzellen und Nierenkanälchen. Villin führt zur Aktin-Polymerisation und Quervernetzung von Aktinfilamenten (Athman et al. 2002). Eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts könnte für die morphologischen Veränderungen in den HNF4 α -exprimierenden Zellen verantwortlich sein.

DSC2 ist ein Transmembranglykoprotein vom Cadherin-Typ, das als Bestandteil von Desmosomen die Verbindung benachbarter Zellen vermittelt. Intrazellulär steht DSC2 über desmosomale Plaque-Proteine mit dem Intermediärfilament-Zytoskelett in Verbindung (Koch

and Franke 1994;Kowalczyk et al. 1999). Da die desmosomale Adhäsion die epitheliale Morphogenese beeinflusst (Runswick et al. 2001), stellt DSC2 ein Kandidat für die beobachteten morphologischen Veränderungen in HNF4 α -exprimierenden Zellen dar. DSC2 könnte auch wie viele Zelladhäsionsproteine nicht nur an die Zelladhäsion sondern auch an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sein und dadurch die Proliferation beeinflussen.

Myotubularin (MTM1) ist eine Lipidphosphatase, welche Phosphatidylinositol-3-phosphat dephosphoryliert (Taylor et al. 2000) und wahrscheinlich an der Regulation des PI3K/Akt-Signalweges beteiligt ist (Laporte et al. 2001). Darüber hinaus induziert die Expression von humanen MTM1 in *S.pombe* eine Wachstumshemmung (Blondeau et al. 2000). Somit ist MTM1 ebenfalls ein möglicher Kandidat der Proliferationskontrolle.

SEPP1 (Selenoprotein P) ist ein Plasmaprotein, welches mehrere Selenocystein-Reste enthält und 50% des Selens im Plasma darstellt. Ferner ist SEPP1 an der Selen-Homeostase beteiligt und übt eine extrazelluläre antioxidative Funktion aus (Burk and Hill 2004;Mostert 2000). SELENBP1 gehört zur Familie der Selen-bindenden Proteine. Die genaue Funktion des SELENBP1s bleibt jedoch noch unbekannt (Chang et al. 1997). Da Selen eine antikarzinogene Wirkung ausübt (Patrick 2004), stellen beide Proteine interessante Kandidaten dar. Es wurde vorgeschlagen, dass die Effekte von Selen in der Krebsprävention über Selen-bindende Proteine vermittelt werden (Medina and Morrison 1988). Folglich könnten SEPP1 und SELENBP1 als Tumorsuppressor agieren und antiproliferativ wirken. Darüber hinaus wurde interessanterweise in mehreren Berichten eine verminderte Expression von SELENBP1 in verschiedenen Adenokarzinomen bewiesen (Chen et al. 2004;He et al. 2004).

Aus den aufgeführten Gründen stellen die ausgesuchten Gene WT1, VIL1, DSC2, MTM1, SEPP1 und SELENBP1 gute Kandidaten für die Vermittlung der HNF4 α -Effekte dar.

12 Überexpression der Kandidatengene WT1, MTM1, SEPP1 und DSC2

Die Mikroarray-Analyse ergab, dass HNF4 α eine hohe Anzahl von Genen in HEK293 Zellen reguliert. Um bei dieser hohen Anzahl von Genen, die HNF4 α -regulierte Gene aufzudecken,

die für die beobachteten Effekte von HNF4 α verantwortlich sind, bieten sich verschiedene Methoden an. Kandidatengene wurden zunächst durch Überexpression analysiert. Dabei sollte untersucht werden, ob durch die Expression dieser Gene die gleichen antiproliferativen und morphologischen Effekte wie durch HNF4 α hervorgerufen werden.

Die Gene WT1, VIL1, MTM1, SEPP1, SELENBP1 und DSC2, die in der Mikroarray-Analyse identifiziert und durch Real-time PCR bestätigt wurden, wurden für die Überexpressionsstudien ausgewählt. Diese Gene wurden ausgesucht, weil sie mit der Proliferation oder Zellmorphologie in Zusammenhang stehen (s. III.11). Da kein Expressionsplasmid für SELENBP1 erhalten wurde und für VIL1 ein Expressionsplasmid mit einer falschen Sequenz zur Verfügung gestellt wurde, konnte der Effekt der Überexpression dieser zwei Gene nicht analysiert werden.

12.1 Etablierung der Zelllinien, die die Kandidatengene konditional exprimieren

Zur Etablierung von Zelllinien, die die Kandidatengene konditional exprimieren, wurden zuerst die korrespondierenden cDNAs, die von anderen Laboren zur Verfügung gestellt wurden, in das Plasmid pcDNA5/FRT/TO kloniert (s. II.2.2). Durch Flp-Rekombination wurden dann die cDNAs in die Flp-In T-REx 293 Zelllinie in der gleichen Weise wie die HNF4 α -cDNA integriert (s. III.1 und II.6). Fünf unabhängige Zelllinien wurden jeweils für jedes Konstrukt etabliert. Die zwei Zelllinien, die die niedrigste β -Galaktosidase-Aktivität zeigten, was auf eine erfolgreiche Rekombination hinwies, wurden für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Zunächst wurde die Induktion der stabil transfizierten Gene in den verschiedenen etablierten Zelllinien charakterisiert.

12.1.1 WT1-Zelllinien

Für das WT1-Gen wurden Zellen, die die Spleißvarianten c oder d exprimieren, etabliert. Diese zwei Spleißvarianten werden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von HNF4 α induziert, da die regulierte Probe des Mikroarrays die vier Spleißvarianten erkennt, während eine Probe, die die Spleißvarianten a und b detektiert, nicht differentiell exprimiert war.

Jeweils zwei Zelllinien für jede WT1-Spleißvariante wurden analysiert. Die Induktion wurde zunächst auf Proteinniveau mittels Western Blot mit Hilfe eines anti-WT1-Antikörpers untersucht. Nach 24 Stunden Tet-Behandlung war eine deutliche spezifische WT1-Bande mit der zu erwartenden Größe von 50 kDa in den induzierten Zellen erkennbar. Bei den Kontrollzellen war ebenfalls eine spezifische WT1-Bande zu sehen. Dieses Ergebnis deutete

darauf hin, dass die Expression des eingeführten WT1-Gens in dem nicht induzierten Zustand nicht vollständig reprimiert war (Abb. III.20A).

Eine immuncytochemische Analyse zur Lokalisierung des WT1- Proteins in der Zelle wurde durchgeführt. In den induzierten Zellen war eine spezifische Immunfluoreszenz des WT1- Proteins im Zellkern erkennbar. Die Kontrollzellen ohne Tet zeigten jedoch auch eine spezifische obwohl etwas schwächere Immunfluoreszenz (Abb. III.20B).

Die etablierten Zellen exprimieren das eingeführte WT1-Gen und zusätzlich noch das endogene WT1-Gen. Um herauszufinden, ob es sich bei dem detektierten WT1-Protein in den Kontrollzellen um das endogene WT1 oder um das eingebrachte WT1 handelte, wurde mittels Western Blot das Proteinniveau der etablierten WT1-Zellen mit dem WT1-Proteinniveau der HNF4 α -Zellen verglichen (Abb. III.20C). Der Vergleich ergab, dass das Proteinniveau sowohl in den nicht induzierten als auch in den induzierten WT1-Zellen weit über das endogene und das durch HNF4 α induzierte WT1-Proteinniveau war.

Obwohl aufgrund der hohen Expression im reprimierten (-Tet)-Zustand die Induktion in den etablierten Zellen nicht optimal war, zeigte sich nach Tet-Zugabe eine deutliche Zunahme in dem WT1-Proteinnivau. Die etablierten Zellen wurden für die weitere Analyse der Proliferation und Morphologie eingesetzt.

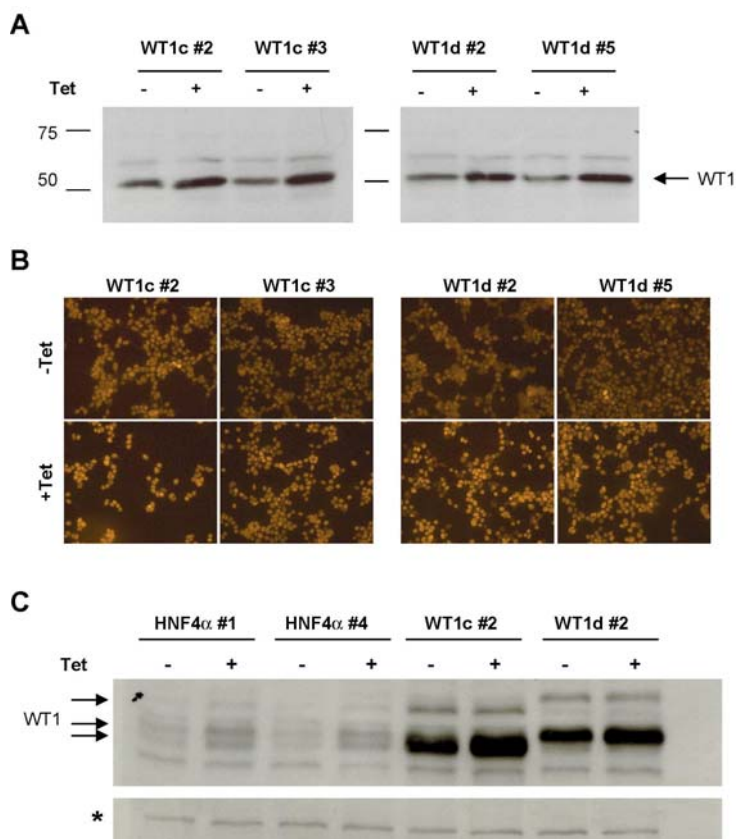


Abb. III.20: Analyse der Induktion in den etablierten WT1-Zelllinien. Analyse mit dem anti-WT1-Antikörper WT (C-19) (Santa Cruz Biotechnology). **(A)** Western Blot nach 24 Std. Tet-Induktion. **(B)** Immunfluoreszenz nach 24 Std. Tet-Induktion. **(C)** Vergleich des WT1-Proteinniveaus in den etablierten WT1-Zellen und in den HNF4 α -Zellen nach Tet-Induktion. Western Blot nach 24 Std. Induktion. Die Pfeile geben die Laufhöhen des WT1-Proteins an. Die unten angezeigte unspezifische Bande (*) dient als Ladekontrolle.

12.1.2 DSC2-Zelllinien

Als zweites wurde die Induktion in den etablierten DSC2-Zelllinien untersucht. Zunächst wurde mittels Real-time PCR mit einer TaqMan-Sonde gegen humanes DSC2 die Induktion auf RNA-Ebene untersucht. Die Menge des DSC2-Transkripts wurde in den Kontrollzellen und in den mit Tetracyclin behandelten Zellen nach 24 Stunden Induktion bestimmt. Es wurde eine deutliche Induktion gemessen, 405-fach bei DSC2#2 und 129-fach bei DSC2#3 (Abb. III.21A). Die Transkriptmenge in den DSC2-Zelllinien wurde auch mittels Real-time PCR mit dem endogenen DSC2-Niveau verglichen. Der Vergleich zeigte, dass das DSC2-Niveau in den nicht induzierten Zellen mit dem endogenen DSC2-Niveau übereinstimmt, so dass die Expression des Transgens in den Zellen effektiv reprimiert wurde (Abb. III.21A).

Da die stabil eingebrachte DSC2-cDNA ein myc-Tag trug, war das DSC2-Protein mit einem anti-myc Antikörper in der Immunfluoreszenz detektierbar. In der Immunfluoreszenz-Analyse konnte man erkennen, dass sich das DSC2 in der Zytoplasmamembran befand und in den Zellkontakten akkumulierte (Abb. III.21B).

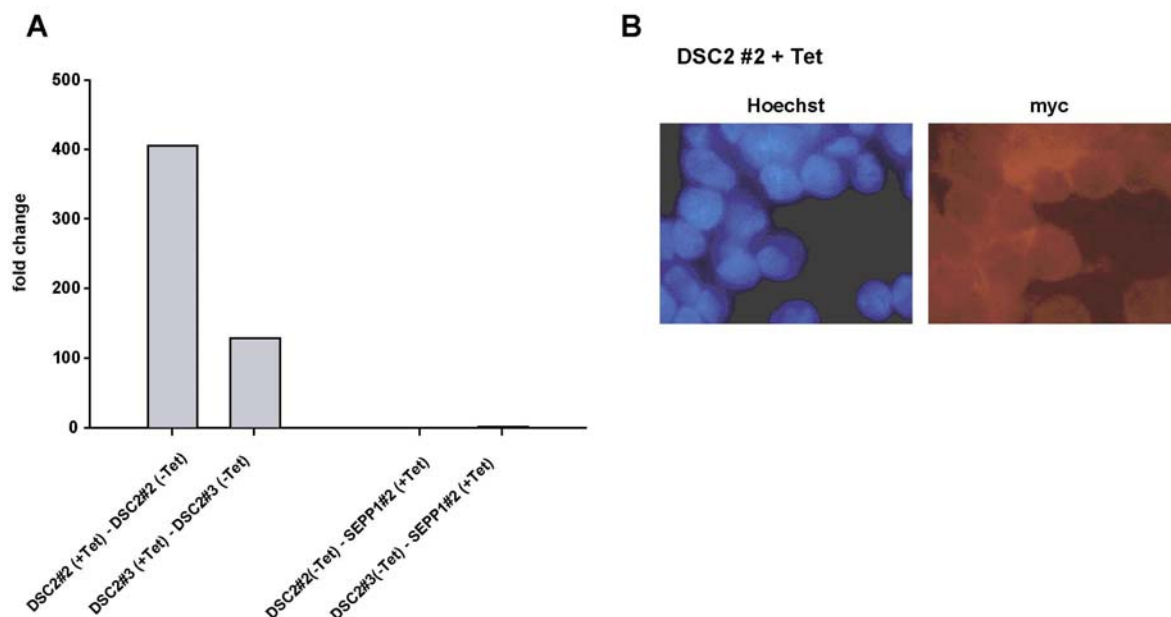


Abb. III.21: Analyse der Induktion in den etablierten DSC2 Zelllinien. (A) Real time PCR mit der TaqMan-Sonde (TaqMan Gene Expression Assay) für humanes DSC2. Die Induktion (fold change) der induzierten im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen ist angegeben. Um die Transkriptmenge in den nicht induzierten Zelllinien mit dem endogenen DSC2 zu vergleichen, wurde die Transkriptmenge in den nicht induzierten DSC2#2- und DSC2#3-Zelllinien mit der Transkriptmenge in der SEPP1#2 Zelllinie verglichen. Der Vergleich ergab eine fold change von 1,0 für DSC2#2 und 1,6 für DSC2#3. Die Induktion wurde mit der $\Delta(\Delta C_t)$ Methode berechnet. **(C)** Immunfluoreszenz nach 24 Std. Induktion mit dem myc-Antikörper 9E10.

12.1.3 MTM1-Zelllinien

Die Analyse der Induktion in den zwei MTM1-Zelllinien MTM1#2 und MTM1#5 ergab sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine deutliche Induktion nach Tet-Zugabe. Die Bestimmung der mRNA-Expression mittels quantitativer Real-time PCR mit einer TaqMan-

Sonde gegen humanes MTM1 zeigte eine Zunahme um 13-fach in der MTM1#2- und um 24-fach in der MTM1#5-Zelllinie in den induzierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen (Abb. III.22A). Bei der Analyse der Induktion im Western Blot war nach 24 Stunden eine deutliche spezifische Bande erkennbar, während in den nicht induzierten Zellen keine detektierbare Menge an MTM1 vorhanden war (Abb. III.22B).

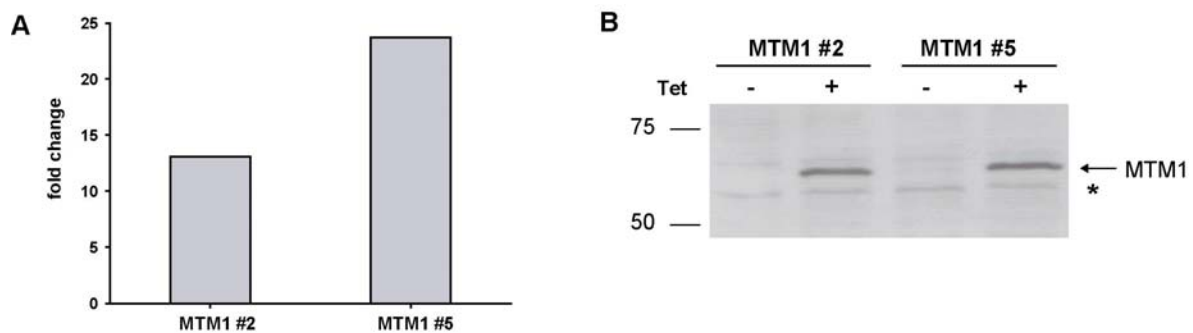


Abb. III.22: Analyse der Induktion in den etablierten MTM1 Zelllinien. (A) Mittels Real time PCR mit dem TaqMan Gene Expression Assay für humanes MTM1 wurde die Menge des MTM1-Transkripts in den induzierten und nicht induzierten Zellen nach 24 Stunden bestimmt. Die Induktion (fold change) der induzierten gegenüber den nicht induzierten Zellen ist angegeben. Die Induktion wurde mit der $\Delta(\Delta C_t)$ Methode berechnet. (B) Western Blot nach 24 Std. Induktion mit dem anti-MTM1-Antikörper Myotubularin, C-18 (Santa Cruz Biotechnology). Der Pfeil gibt die Laufhöhe von MTM1 an. Die unspezifische Bande unterhalb der MTM1-Bande (*) dient als Ladekontrolle.

12.1.4 SEPP1-Zelllinien

Da kein Antikörper für humanes SEPP1 verfügbar war, wurde die Induktion in den Zelllinien SEPP1#1 und SEPP1#2 nur auf RNA-Ebene untersucht. Mittels Real-time PCR mit TaqMan-Sonden wurde die Transkriptmenge nach 24 Stunden Induktion ermittelt. In beiden untersuchten Zelllinien wurde eine deutliche Induktion nach Tet-Zugabe beobachtet (Abb. III.23). Das SEPP1-Niveau in den nicht induzierten SEPP1-Zelllinien war etwa 3-mal höher

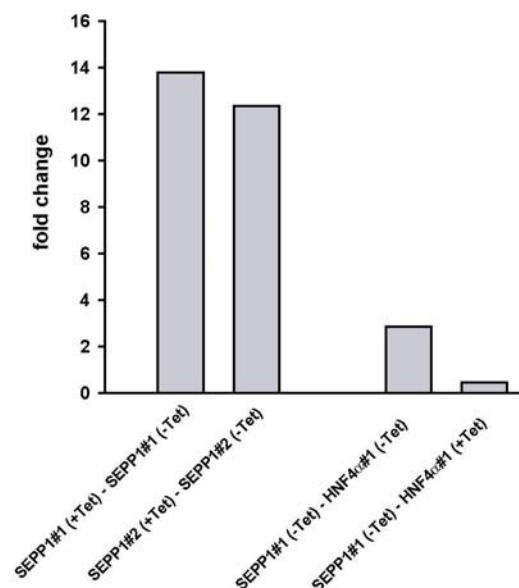


Abb. III.23: Analyse der Induktion in den etablierten SEPP1-Zelllinien. (A) Mittels Real time PCR mit dem TaqMan Gene Expression Assay für humanes SEPP1 wurde die Menge des SEPP1-Transkripts in den induzierten und nicht induzierten Zellen nach 24 Stunden bestimmt. Die Induktion wurde mit der $\Delta(\Delta C_t)$ Methode berechnet. Für SEPP1#1 und SEPP1#2 ist die Induktion (fold change) der induzierten (+Tet) gegenüber den nicht induzierten Zellen (-Tet) angegeben. Das SEPP1-Niveau in den nicht induzierten SEPP1#1-Zellen wurde ebenfalls mit dem SEPP1-Niveau in den HNF4α#1-Zellen verglichen. Der Vergleich ergab eine fold change von 2,9 für SEPP1#1(-Tet)-HNF4α#1(-Tet) und 0,45 für SEPP1#1(-Tet)-HNF4α#1(+Tet).

als das endogene SEPP1-Niveau, betrug jedoch nur die Hälfte des induzierten SEPP1-Niveaus nach HNF4 α -Expression.

Insgesamt ergab die Charakterisierung der etablierten Zelllinien für die Kandidatengene, dass in allen Zelllinien die Transkripte wirksam durch Zugabe von Tetracyclin induziert wurden.

12.2 Untersuchung der Proliferation und Morphologie nach Überexpression der Kandidatengene

Nach Charakterisierung der etablierten Zelllinien wurde untersucht, ob die Überexpression der Kandidatengene die gleichen Effekten wie die HNF4 α -Überexpression auslöste.

Die Wirkung der Gene auf die Proliferation wurde mittels MTS-Test analysiert. Nach Expression der untersuchten Kandidatengene wurde keine Proliferationsänderung beobachtet (Abb. III.24).

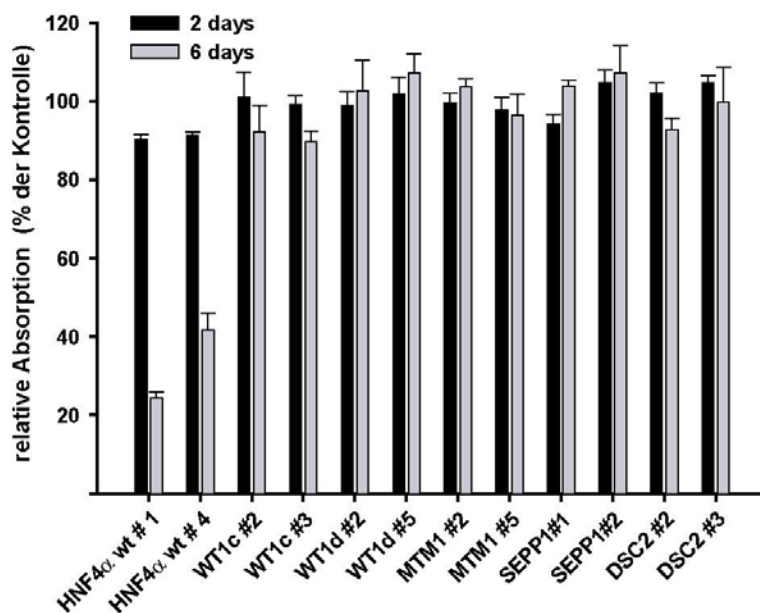


Abb. III.24: Die analysierten Kandidatengene haben keinen Einfluss auf die Proliferation der HEK293 Zellen. Die Zellen wurden ohne und mit Tetracyclin kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zellzahl mittels MTS-Test bestimmt. Die Zellzahl ist in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen gezeigt. Die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) eines als Dreifachbestimmung angefertigten repräsentativen Experimentes sind jeweils angegeben.

Darüber hinaus wurde nach Induktion der Kandidatengene in allen Zelllinien keine Veränderung der Morphologie festgestellt.

Da die Expression der Kandidatengene WT1c, WT1d, DSC2, MTM1 und SEPP1 in den HEK293 Zellen nicht ausreicht, um die Zellproliferation zu inhibieren oder die Zellmorphologie zu verändern, lässt sich folgern, dass diese Gene allein nicht für die HNF4 α -Wirkung verantwortlich sind.

13 Reduktion der Genaktivität der Kandidatengene WT1, MTM1 und VIL1 mittels RNAi

Um die HNF4 α -Zielgene zu identifizieren, die die HNF4 α -Effekte vermitteln, wurde als eine zweite alternative Methode das Ausschalten einzelner HNF4 α induzierter Gene mittels RNA-Interferenz (RNAi) eingesetzt. Die Inaktivierung der Gene, die für die HNF4 α -Effekte verantwortlich sind, sollte zum Verlust oder mindestens zu einer Abnahme der HNF4 α -Effekte führen.

Die RNAi-Methode beruht auf dem sequenz-spezifischen, posttranskriptionalen „gene-silencing“, das durch doppelsträngige siRNA (small interfering RNA), die homolog zu der Sequenz des entsprechenden Gens ist, ausgelöst wird (Elbashir et al. 2001) (s. II.10). Für die RNAi-Methode wurden in dieser Arbeit siRNA-Kassetten eingesetzt. Diese sind PCR-Produkte, die shRNAs (short hairpin RNA) generieren, die in der Zelle durch das Dicer-Enzym in siRNA-Moleküle gespalten werden (Castanotto et al. 2002; Paddison et al. 2004).

13.1 siRNA-Kassetten

Die siRNA-Kassetten wurden zunächst transient in die Flp-In T-REx 293 Zelllinie transfiziert. Um die Transfektionsbedingungen zu optimieren, wurde als erstes die siRNA-Kassette gegen Luziferase unter der Regulation des H1-Promotors (H1siFLuc, GenScript) in die Zellen transfiziert. Die H1siFLuc-Kassette wird als Positivkontrolle mit nachgewiesenem hohem Gen-inaktivierendem Effekt von der Firma GenScript verkauft. Um deren Wirkung zu bestimmen, wurde die Luziferase-siRNA-Kassette zusammen mit dem pGL3-Control Vektor, welcher für die Luziferase kodiert, kotransfiziert. Der Effekt der Kassette auf die Luziferase-Expression wurde durch Messung der Luziferase-Aktivität mittels Luziferase-Assay (s. II.10.4) ermittelt. Unterschiedliche Konzentrationen an siRNA-Kassette wurden getestet (Abb. III.25).

Der Test machte deutlich, dass die H1siFLuc-Kassette die Expression des transfizierten Luziferase-Gens einschränkte. Die Transfektionen mit 800 und 1000 ng siRNA-Kassette pro Schale erwiesen sich als die effektivsten. In den nachfolgenden Experimenten wurden 800 ng siRNA-Kassette pro 12 well eingesetzt, da bei dieser Konzentration der toxische Effekt geringer als bei 1000 ng war.

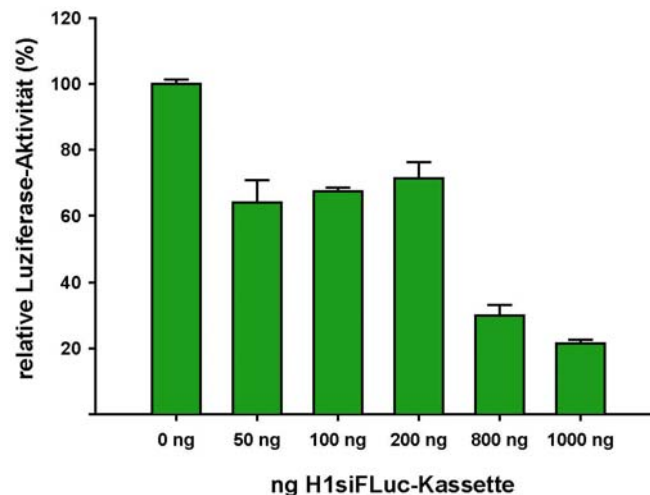


Abb. III.25: Optimierung der Transfektionsbedingungen mit der siRNA-Kassette gegen Luziferase H1siFLuc. Die siRNA-Kassette gegen Luziferase mit dem H1-Promotor H1siFLuc (GenScript) wurde in 12well-Schalen (2×10^5 Zellen/well) in den angegebenen Mengen zusammen mit 160 ng des Vektors pGL3-Control (Promega), welcher für die Luziferase kodiert, transfiziert. 24 Std. nach Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität mittels Luziferase-Assay ermittelt. Für jede Konzentration wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Luminiszenz-Werte wurden auf die Anzahl der Zellen durch Messung der Proteingesamtkonzentration mittels Bradford normalisiert. Die relative Luziferase-Aktivität im Vergleich zu der mit 0 ng transfizierten Kontrolle ist in Prozent angegeben. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von einer Doppelbestimmung. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Als nächstes wurden siRNA-Kassetten gegen die Kandidatengene WT1, MTM1 und VIL1 getestet. Für jedes Gen wurden zwei Kassetten mit zwei unterschiedlichen Sequenzen untersucht. Die Effektivität des "gene silencing" wurde durch Bestimmung der mRNA-Expression mittels quantitativer Real-time PCR überprüft.

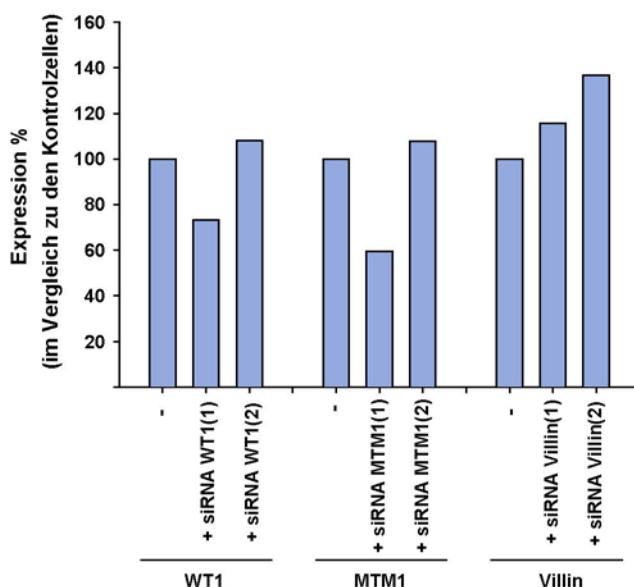


Abb. III.26: Die siRNA-Kassetten gegen WT1, MTM1 und Villin zeigen eine sehr geringe Effizienz. Für jedes Gen wurden zwei verschiedene siRNA-Sequenzen eingesetzt (1) und (2). 2×10^5 Zellen/well der HNF4 α wt#1 Zelllinie wurden mit jeweils 800 ng siRNA-Kassette transfiziert. 3 Std. nach der Transfektion wurde das Medium durch Medium mit 1 μ g/ml Tet gewechselt. 24 Std. danach wurde die RNA isoliert. Mit TaqMan Sonden (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems) gegen WT1, MTM1 und Villin wurde die Menge der Transkripte quantifiziert. Zellen ohne transfizierte siRNA (-) wurden als 100% gesetzt. Die Werte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung.

Die Zelllinie HNF4 α #1 wurde mit den Kassetten transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion und gleichzeitiger HNF4 α -Induktion wurde die RNA isoliert und die Menge der WT1, MTM1 und VIL1 Transkripte mittels Real-time PCR ermittelt. Nur die siRNA-Kassetten

WT1(1) und MTM1(1) zeigten eine geringe Reduktion der korrespondierenden mRNAs (bis 73% und 59%). Die anderen untersuchten siRNA-Kassetten zeigten keine Wirkung auf die Expression der betreffenden Gene (Abb. III.26).

Die geringe Effizienz der siRNA-Kassetten konnte an den ausgewählten siRNA-Sequenzen liegen, da statistisch nur eine von vier Sequenzen für die RNAi geeignet ist. Ein anderer Grund für die geringe Inhibierung der Expression konnte die transiente Transfektion sein, wo nicht alle Zellen transfiziert werden.

13.2 siRNA-Zelllinien

Um eine möglichst effektive und lang anhaltende Inhibierung der Genexpression zu erzielen, wurden die siRNA-Kassetten stabil in die Zellen eingebracht. Da die Reduktion der Proliferation erst nach 3-4 Tagen deutlich messbar war, konnten die Effekte der Herunterregulation der Gene auf die Zellproliferation nur anhand einer lang anhaltenden Wirkung der siRNA-Kassetten analysiert werden.

Für die stabile Transfektion der siRNA-Kassetten in die Flp-In T-REx 293 Zelllinie wurden zuerst die Kassetten in den Vektor pcDNA5/FRT/TO-HNF4 α über einen eingeführten Linker kloniert (s. II.10.3). Der entstandene Vektor kodierte gleichzeitig HNF4 α und die eingebrachte siRNA-Kassette. Der Vektor wurde in die Zellen durch Flp-Rekombination stabil transfiziert (s. II.6 und III.1). Auf diese Weise wurden Zellen hergestellt, die HNF4 α nach Tetracyclin-Induktion überexprimierten und gleichzeitig eine siRNA gegen ein bestimmtes Gen generierten.

Luziferase-siRNA Zelllinien

Um das System zu testen, wurden Zelllinien hergestellt, die die siRNA gegen das Luziferase-Gen stabil exprimierten. Die siRNA-Kassette gegen die Luziferase hatte eine effektive Inhibierung der Expression in der transienten Transfektion gezeigt und war deswegen für den Test des Systems geeignet. Zelllinien mit der H1siFLuc-Kassette (H1-Promotor) und mit der U6siFLuc-Kassette (U6-Promotor) wurden hergestellt. Die Zelllinien, die die beste Rekombination im β -Galaktosidase-Test zeigten, wurden analysiert. Die siRNA-Effizienz in 5 Luziferase-Zelllinien und 3 Kontrollzelllinien, die siRNA gegen Villin, WT1 oder keine siRNA exprimierten, wurden durch Transfektion eines Luziferase-kodierenden Vektors und Messung der Luziferase-Aktivität analysiert (Abb.III.27). Nur die Zelllinien H1siFLuc#3 und

#5 zeigten eine signifikante Inhibierung der Luziferase-Aktivität, aber diese erreichte nur 60% der Aktivität der Negativkontroll-Zelllinien. Die anderen untersuchten siFLuc-Zelllinien wiesen die gleichen Luziferase-Aktivitäten wie die Kontrollzelllinien auf.

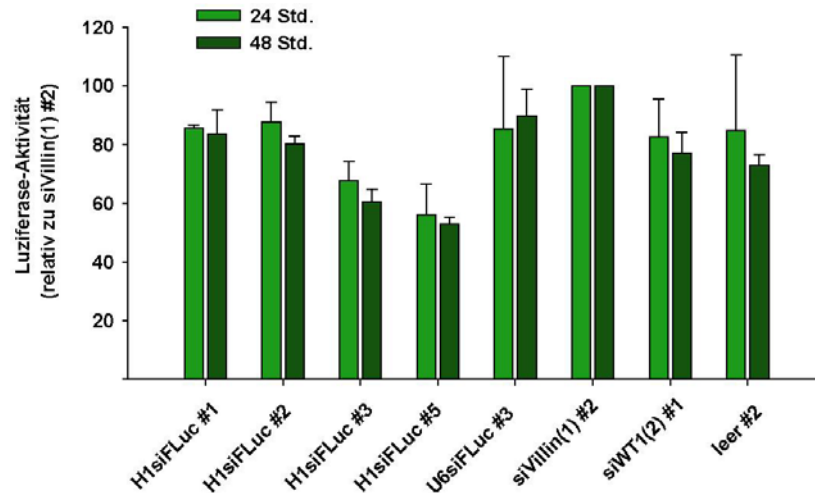


Abb. III.27: Analyse der Luziferase-siRNA Zelllinien. Luziferase-Assay. Die angegebenen Zelllinien wurden mit dem Vektor CMV-Luc, welcher für die Luziferase kodiert, transfiziert. Als Negativkontrollen dienten die Zelllinien mit siRNA gegen Villin, WT1 und ohne siRNA (leer). 24 und 48 Std. nach Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität mittels Luziferase-Assay ermittelt. Die relative Luziferase-Aktivität im Vergleich zu der siVillin(1) #2 Zelllinie ist im Prozent angegeben. Die Werte sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung.

Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die stabile Transfektion der siRNA-Kassette gegen Luziferase nur in einigen etablierten Zelllinien zu einer geringen Herunterregulation der betreffenden mRNA führte.

HNF4 α -siRNA Zelllinien

Zelllinien wurden ebenfalls hergestellt, die gleichzeitig HNF4 α und eine siRNA gegen HNF4 α exprimierten. Diese Analyse sollte aufzeigen, ob die Herunterregulation von HNF4 α zu der zu erwartenden Abnahme der Effekte führte. Jeweils 3 Zelllinien wurden für 4 unterschiedliche ausgewählte HNF4 α -siRNA Sequenzen etabliert und die zwei Zelllinien, die die beste Rekombination im β -Galaktosidase-Test zeigten, wurden analysiert. Mittels Western Blot wurden die stabil eingebrachten siRNAs auf ihre Funktionalität überprüft. Zum Vergleich dienten mit Villin-siRNA stabil transfizierte Zellen, die das HNF4 α -Gen nicht reprimieren sollten (Abb. III.28A). Die genaue Analyse des Western Blots war nicht einfach, da die zwei Negativkontrollen einen Expressionsunterschied aufwiesen. Aber trotzdem konnte man beobachten, dass die Zelllinien (3)#2 und (3)#3 den höchsten Effekt zeigten, der eine signifikante Herunterregulation darstellte. Bei den anderen Zelllinien war nur eine geringe Reduktion im Vergleich zu den Kontrollen sichtbar.

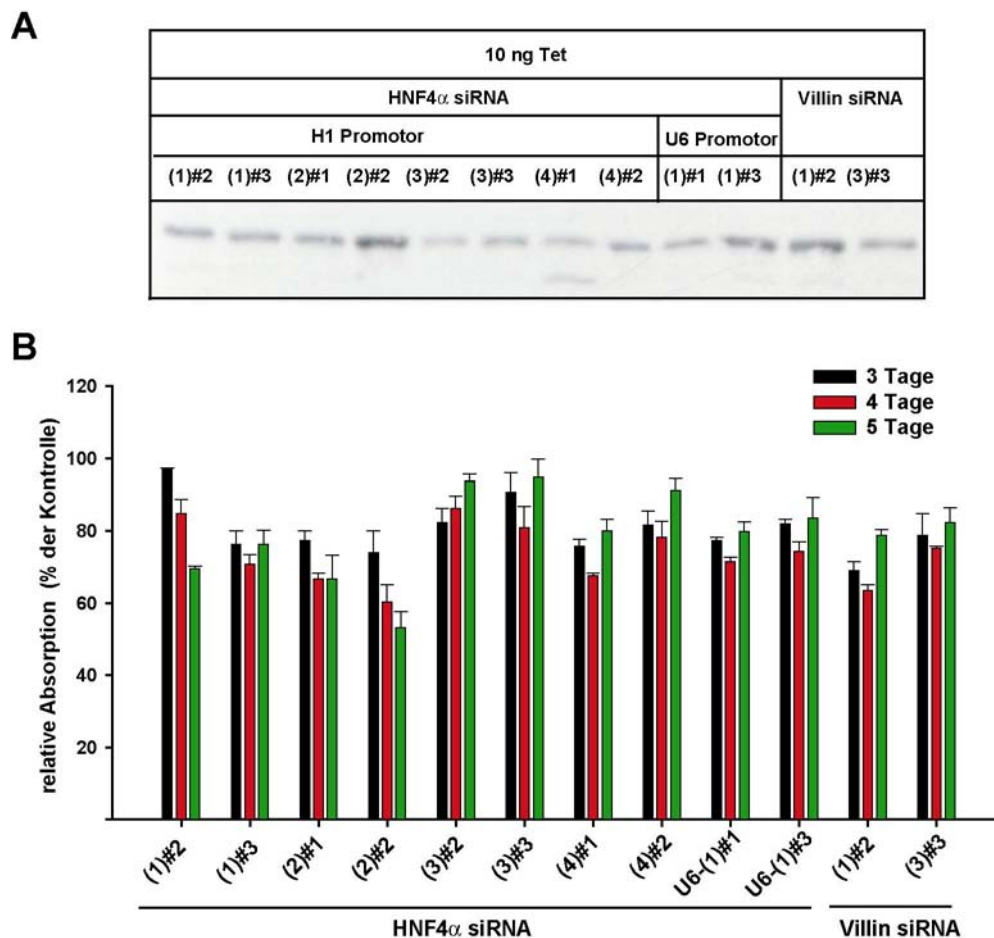


Abb. III.28: Analyse der HNF4 α siRNA-Zelllinien. (A) Die Menge an HNF4 α -Protein in den siHNF4 α -Zelllinien und als Kontrolle in den siVillin-Zelllinien wurde mittels Western Blot mit myc-spezifischen Antikörper 9E10 untersucht. Die Zelllinien wurden für 48 Std. mit 10 ng/ml Tet induziert. 5 μ g Proteinextrakt wurde auf das Gel aufgetragen. (B) Proliferationsbestimmung mittels MTS-Test. Die Zelllinien wurden ohne und mit Tetracyclin (10 ng/ml) kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Umsatz von MTS bei OD 490 nm ermittelt. Die Ergebnisse zeigen die Werte für die induzierten Zellen in Prozent der nicht induzierten Zellen (100 %). Die Ergebnisse sind die Mittelwerte von einem Experiment, das in Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Die Proliferation der Zelllinien wurde mittels MTS-Test untersucht (Abb. III.28B). Der Test ergab, dass in fast allen HNF4 α -siRNA Zelllinien die gleiche Abnahme der Proliferation wie in den Villin-siRNA Kontrollzelllinien stattfand. Wahrscheinlich wurde bei diesen Zelllinien das HNF4 α -Protein nicht in ausreichendem Maß reduziert, um eine Abnahme der Proliferationshemmung zu bewirken. Die Zelllinien HNF4 α -siRNA(3)#2 und (3)#3 zeigten aber eine signifikante geringere Hemmung der Zellvermehrung. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Western Blot Ergebnis überein. In den Zelllinien HNF4 α -siRNA (3)#2 und (3)#3, wo weniger HNF4 α exprimiert wurde, war der inhibitorische Effekt von HNF4 α auf die Proliferation auch geringer.

Die Analyse der stabilen siHNF4 α -Zelllinien zeigte, dass eine effektive Herunterregulation nur in wenigen der etablierten Zelllinien stattfindet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Repression von HNF4 α mittels siRNA kaum zu einer Abnahme der Proliferationshemmung führt.

Kandidatengene-siRNA Zelllinien

Zelllinien wurden ebenfalls hergestellt, die gleichzeitig HNF4 α und siRNA gegen WT1, Villin und MTM1 exprimierten. Für WT1 und Villin wurden zwei siRNA-Sequenzen und für MTM1 eine Sequenz in die Zellen stabil eingebracht. Für jede siRNA-Sequenz wurden drei unabhängige Zelllinien etabliert und diejenigen, die die beste Rekombination in dem β -Galaktosidase-Test zeigten, wurden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Mittels Real-time PCR wurde die Effektivität der stabil eingebrachten siRNAs überprüft. In keiner der Zelllinien konnte eine signifikante Reduktion der Expression des entsprechenden Gens festgestellt werden. Die maximale Reduktion der Expression betrug 70% (Abb. III.29).

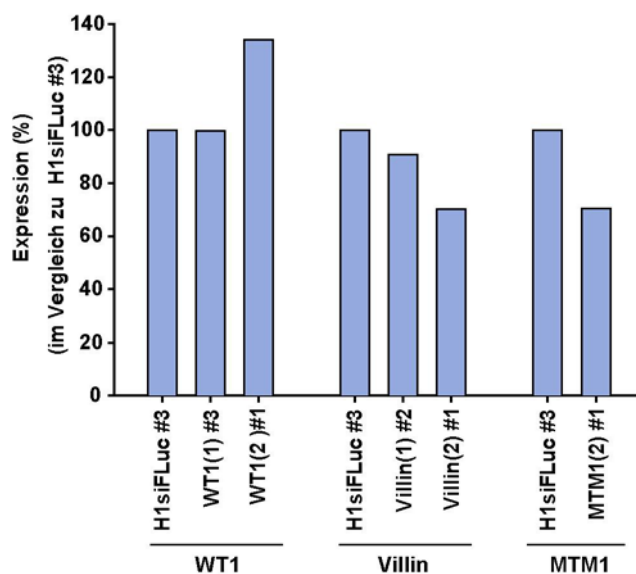


Abb. III.29: Analyse der WT1, MTM1 und Villin siRNA-Zelllinien. Real-time PCR-Analyse. 48 Std. nach HNF4 α -Induktion mit 1 μ g/ml Tet wurde die RNA isoliert. Die Real-time PCR wurde mit den TaqMan-Sonden (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems) gegen WT1, Villin und MTM1 durchgeführt

Insgesamt lässt sich folgern, dass die stabile Transfektion der siRNA-Kassetten nur eine geringe Effektivität zeigte. Mindestens vier Sequenzen für jede siRNA-Kassette sollten getestet werden.

Aufgrund der geringen Reduktion der Genaktivitäten konnte mittels siRNA nicht untersucht werden, ob die ausgewählten Kandidatengene die HNF4 α -Effekte vermitteln.

IV Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von HNF4 α in der Proliferation von Nierenzellen untersucht. Dazu wurden HEK293 Zellen etabliert, die HNF4 α in einer effizienten regulierbaren Form exprimieren. Zwei Ziele standen im Zentrum der Arbeit: Wie wirkt die HNF4 α -Expression auf das Zellwachstum und welche Gene werden in HEK293-Zellen durch HNF4 α reguliert? Die erarbeiteten Ergebnisse und ihre Bedeutung werden im Folgenden diskutiert.

1 Etablierung von HEK293 Zellen, die HNF4 α konditional exprimieren

Zur Untersuchung der Funktion von HNF4 α in Nierenzellen wurde als Modell die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293 ausgewählt. Der Einsatz dieser Zelllinie rechtfertigte sich damit, dass in Vorarbeiten des Labors sich erste Indizien für einen Einfluss von HNF4 α auf die Proliferation dieser Zellen ergeben hatten (Dissertation J.Lausen 2001; <http://miless.uni-duisburg-essen.de>). Die HEK293 Zellen sind aus humanen embryonalen Nierenzellen durch Transformation von DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 hervorgegangen (Graham et al. 1977). Sie repräsentieren einen Zelltyp entlang der Differenzierung des kondensierten Mesenchyms zu dem S-förmigen Körper in der Nephrogenese (Torban and Goodyer 1998). Die HEK293 Zelllinie exprimiert kein endogenes HNF4 α (Jiang et al. 2003), so dass alle mit dieser Zelllinie untersuchten HNF4 α -Funktionen nur von der Expression des exogenen HNF4 α abhängen. Die HEK293 Zellen werden seit vielen Jahren als Modell für Nierenzellen eingesetzt. Jedoch exprimieren HEK293 Zellen viele neuronspezifische Proteine (Shaw et al. 2002), so dass sie eventuell kein geeignetes Modell für epitheliale Nierenzellen darstellen. In der vorliegenden Arbeit konnte aber festgestellt werden, dass durch HNF4 α in HEK293 Zellen viele Gene reguliert werden, die spezifisch in der Niere exprimiert werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass HEK293 Zellen als Modell für Nierenzellen geeignet sind.

HEK293 Zellen, die HNF4 α wt und die HNF4 α -Mutanten C106R und R154X sowie GFP konditional exprimieren, wurden hergestellt. Der Einsatz der Zelllinie Flp-In T-REx 293 zur Herstellung der stabilen Zellen erwies sich als sehr effektiv. Die Zelllinie Flp-In T-REx 293,

die sich von der HEK293 Zelllinie ableitet, enthält eine FRT-Stelle, so dass durch Flp-vermittelte Rekombination eine Einzelkopie der Transgene an eine einzige chromosomale Stelle integriert wird. Dadurch entsteht eine homogene Zellpopulation, in der das Expressionsniveau in allen Zellen sehr ähnlich ist, und die Zellen vereinigt werden können. Mit dieser Methode entfällt die aufwendige Isolierung und Analyse von Einzelkolonien, die in den herkömmlichen Methoden durchgeführt werden muss. Darüber hinaus enthält die Flp-In T-REx 293 Zelllinie einen Tet-Repressor und erlaubt durch Tet-Zugabe die konditionale Expression des integrierten Transgens. Die Etablierung der Zelllinien mit dieser Methode dauerte insgesamt drei bis vier Wochen und war dadurch viel weniger zeitaufwendig als die herkömmlichen Methoden. Darüber hinaus zeigten die etablierten Zellen eine wesentlich höhere Effizienz gegenüber anderen stabilen Zelllinien. In Abwesenheit von Tetracyclin wurden die Gene wirksam durch den Tet-Repressor gehemmt, und die Tetracyclin-Induktion der Konstrukte in den verschiedenen etablierten Zelllinien war sehr effizient. Erwartungsgemäß war die Expression innerhalb jeder Zelllinie, die aus vereinigten Kolonien entstanden war, sehr homogen, und das Ausmaß und der Verlauf der Induktion in den unabhängigen Zelllinien war sehr ähnlich. Zusätzlich wurde auch nach längerer Kultur und Passagen kein Verlust der Induktionsrate beobachtet. Somit waren die etablierten Zelllinien für die Analyse der HNF4 α -Funktion hinsichtlich der Proliferation und für die Identifizierung von HNF4 α -Zielgenen sehr gut geeignet.

Die zwei eingesetzten Mutanten erwiesen sich als gute Kontrollen für die Experimente zur Analyse der Funktion von HNF4 α . Bei der HNF4 α C106R-Mutante handelt es sich um eine künstliche Mutante, in der ein Cystein im zweiten Zinkfinger der DNA-Bindungsdomäne zu einem Arginin mutiert ist. Die Mutation zerstört die Koordination von Zink und verändert die Struktur des Zinkfingers, so dass HNF4 α nicht mehr in der Lage ist, DNA zu binden. Die C106R-Mutante bildet Heterodimere mit HNF4 α wt und wirkt auf diese Weise dominant negativ (DN-HNF4 α in Taylor et al. 1996). Es stellte sich heraus, dass die Mutante im Zellkern lokalisiert war und dass dessen Expressionsniveau dem von HNF4 α wt sehr ähnlich war. Weiterhin zeigte die Mutante in den funktionellen Tests keine Wirkung auf die Proliferation und keine transkriptionelle Aktivität in der Mikroarray-Analyse und eignete sich somit als Negativkontrolle.

Die zweite eingesetzte Mutante, HNF4 α R154X, ist eine natürlich vorkommende MODY1-assoziierte Mutante. Die nonsense Mutation R154X ergibt ein verkürztes HNF4 α -Protein mit einer intakten DNA-Bindungsdomäne aber ohne Ligandenbindungsdomäne (E-Domäne). In

dieser Arbeit zeigte sich, wie bei Laine et al. beschrieben, dass diese Mutante im Zellkern lokalisiert ist (Laine et al. 2000). Zusätzlich wurde festgestellt, dass das Expressionsniveau dieses Proteins geringer als das Expressionsniveau der anderen HNF4 α -Konstrukten war. Dieses Ergebnis könnte auf eine geringere Stabilität des Proteins zurückzuführen sein. In den funktionellen Tests zeigte die R154X-Mutante ebenfalls keinen Effekt und war deswegen als Negativkontrolle geeignet.

2 HNF4 α hemmt die Proliferation der HEK293 Zellen

Durch den Einsatz mehrerer Methoden stellte sich heraus, dass die Expression von HNF4 α in HEK293 Zellen eine proliferationshemmende Wirkung hat. Es konnte gezeigt werden, dass der Effekt von HNF4 α spezifisch war, da die Expression der inaktiven HNF4 α -Mutanten C106R und R154X oder GFP keinen Einfluss auf die Zellproliferation hatte. Diese Funktion als Regulator der Proliferation stellt eine am Anfang dieser Arbeit unbekannte Funktion von HNF4 α dar.

Dem Mechanismus des antiproliferativen Effektes von HNF4 α in HEK293 Zellen wurde nachgegangen. Die durchgeführten Wachstumsexperimente zeigten, dass die Expression von HNF4 α eine Reduktion der Proliferationsrate jedoch keinen Proliferationsstopp auslöste. Es wurde untersucht, ob HNF4 α einen Einfluss auf den Zellzyklus hat. Die durchgeführten Zellzyklus-Untersuchungen belegten, dass der HNF4 α -Effekt nicht auf einen Arrest der Zellen in einer der Phasen des Zellzyklus zurückzuführen war. Es konnte auch eindeutig demonstriert werden, dass HNF4 α keine Apoptose in HEK293 Zellen auslöste. Eine toxische Wirkung der HNF4 α -Expression wurde ebenfalls ausgeschlossen, da HNF4 α keine Nekrose induzierte. Der genaue Mechanismus für die Regulation des Zellwachstums durch HNF4 α in HEK293 Zellen bleibt noch ungeklärt. Es besteht die Möglichkeit, dass die Hemmung der Proliferation auf eine allgemein verlangsamte Zellzyklusprogression beruht. Eine weitere mögliche Erklärung für die Abnahme der Proliferation könnte eine Störung des Stoffwechsels sein. Wenn HNF4 α ebenfalls in Nierenzellen den Metabolismus beeinflusst, könnte die HNF4 α -Überexpression, eine Störung des Stoffwechsels hervorrufen, und dieses zu einer veränderten Wachstumsregulation führen. Eine weitere Möglichkeit, die nicht ausgeschlossen werden kann, ist dass die morphologischen Veränderungen, die von HNF4 α ebenfalls induziert werden, für die verlangsamte Proliferation verantwortlich sind. Wenn die Zellen nicht mehr als Monolayer wachsen, könnte eventuell das optimale Wachstumsverhalten nicht

gewährleistet sein, und die Proliferation könnte gehemmt werden. Ein wichtiger Punkt ist, dass trotz der morphologischen Veränderungen die Zellen sich nicht vom Boden der Kulturschalen lösen, so dass die Abnahme der Zellzahl nicht auf eine Ablösung von Zellen zurückzuführen sein kann. Der genaue Mechanismus der Regulation des Zellwachstums durch HNF4 α bleibt aber noch unklar und muss noch weiter erforscht werden.

Neulich publizierte Studien bewiesen eine proliferationshemmende Wirkung von HNF4 α in anderen Zelllinien und bestätigten somit die Ergebnisse dieser Arbeit. Die Expression von HNF4 α reduziert die Proliferationsrate in murinen Hepatomazellen (fgHCC-H33 Zellen) (Lazarevich et al. 2004), in murinen embryonalen Karzinomzellen (F9-Zellen) und ebenfalls in endothelialen Lungenzellen der Ratte (RLE-Zellen) (Chiba et al. 2005). Somit ist die Regulation der Proliferation durch HNF4 α ein allgemeines Phänomen in unterschiedlichen Zelltypen. Interessant ist ebenfalls, dass in den publizierten Studien die Isoform HNF4 α 1 eingesetzt wurde, während in der vorliegenden Arbeit die Isoform HNF4 α 2 verwendet wurde. Man kann deswegen davon ausgehen, dass sowohl die Isoform HNF4 α 1 als auch HNF4 α 2 eine proliferationshemmende Wirkung ausüben. In der INS-1 Zelllinie, die ein Modell für differenzierte β -Zellen darstellt (Asfari et al. 1992), löst die Expression der HNF4 α 2-Isoform ebenfalls einer Hemmung der Zellproliferation aus. Zusätzlich induziert HNF4 α 2 in dieser Zelllinie den apoptotischen Zelltod (Erdmann et al 2005, eingereicht). Die Tatsache, dass HNF4 α in INS-1 Zellen aber nicht in HEK293 Zellen Apoptose induziert, zeigt, dass HNF4 α als zellspezifischer Transkriptionsfaktor in unterschiedlichen Zelltypen unterschiedliche Effekte haben kann.

Hervorzuheben ist, dass die Induktion von HNF4 α mit 10 ng/ml Tetracyclin, die schätzungsweise eine annähernd physiologische Proteinkonzentration von HNF4 α darstellt, zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation führte. Somit ist anzunehmen, dass die Hemmung der Zellvermehrung durch HNF4 α nicht nur bei Überexpression sondern auch in einem physiologischen Konzentrationsbereich des Transkriptionsfaktors erfolgt.

Für die proliferationshemmende Wirkung von HNF4 α liegen eine Reihe von Indizien vor. Viele Proteine, die für die Aufrechterhaltung des differenzierten Zustands wichtig sind, haben ebenfalls einen proliferationsinhibierenden Effekt. Ein Beispiel dafür stellt der Transkriptionsfaktor MyoD dar (Sorrentino et al 1990). Es ist bekannt, dass HNF4 α wichtig für die Differenzierung und für die Aufrechterhaltung des differenzierten Zustands der

Hepatozyten ist. Aus diesem Grund ist es möglich, dass HNF4 α ebenfalls in Nierenzellen für die Differenzierung und auch für die Hemmung der Proliferation wichtig sein könnte. Interessanterweise wurde vor kurzem berichtet, dass das Retinoblastoma Protein (Rb) die Aktivität des HNF4 α -Proteins durch die Interaktion mit dem HNF4 α Co-Aktivator SRC potenziert (Batsche et al. 2005). Dieser Zusammenhang zwischen dem Retinoblastoma Protein, welches ein Tumorsuppressor ist, und HNF4 α stellt ein weiteres Indiz dafür, dass HNF4 α eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Proliferation spielen könnte.

Eine kürzlich erschienene Studie berichtete, dass die Expression von HNF4 α in murinen embryonalen Karzinomzellen (F9-Zellen) zu der Induktion von p21 sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene führt (Chiba et al. 2005). Die Autoren spekulierten, dass die beobachtete Hemmung der Proliferation nach HNF4 α -Expression durch die Induktion des p21 Gens hervorgerufen werden könnte. Das p21 Gen (CIP1) ist ein Regulator des Zellzyklus, welcher die CDK2-vermittelte Progression von der G1- zu der S-Phase inhibiert (Sherr and Roberts 1999). Darüber hinaus wurde die Induktion des p21-Transkripts durch HNF4 α ebenfalls mittels Mikroarray-Analyse in der Hepatoma-Zelllinie HuH-7 festgestellt (Naiki et al. 2002). Das p21 Gen wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht als HNF4 α -reguliertes Gen identifiziert. Somit kann dieses Gen für die beobachtete Reduktion der Proliferation in HEK293 Zellen nicht verantwortlich sein.

3 HNF4 α verändert die Morphologie der HEK293 Zellen

Die Verringerung der Proliferation nach HNF4 α -Expression war immer von einer Veränderung der Zellmorphologie begleitet. Nach zwei Tagen HNF4 α -Induktion fingen die Zellen an, sich abzurunden, die Zytoplasmaausläufer verschwanden und die Zellen wuchsen nicht mehr als Monolayer. Nach einer längeren Induktionszeit zeigten die induzierten Zellen einen deutlich veränderten Phänotyp im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen. Alle HNF4 α exprimierenden Zellen waren abgerundet und bildeten dreidimensionale Zellaggregate. Die Veränderung der Zellmorphologie war spezifisch auf die Expression von HNF4 α zurückzuführen, da die HNF4 α -Mutanten C106R und R154X und GFP keine Wirkung auf die Morphologie der HEK293 Zellen hatten.

Ein erster Hinweis dafür, dass HNF4 α die Morphologie der Zellen beeinflusst, wurde von Späth und Weiss berichtet (Späth and Weiss 1998). Sie demonstrierten, dass die Expression von HNF4 α in dedifferenzierten Hepatomazellen (H5 Zellen) die Wiederherstellung der differenzierten epithelialen Morphologie induziert. In den letzten Jahren sind eine Reihe von Studien publiziert worden, in denen eine Wirkung von HNF4 α auf die Zellmorphologie ebenfalls festgestellt wurde. Die Expression von HNF4 α induziert in murinen embryonalen Karzinomzellen (F9-Zellen) die Ausbildung von funktionellen Tight Junctions und die Etablierung der epithelialen Zellpolarität (Chiba et al. 2003), während in murinen Fibroblasten (NIH3T3-Zellen) die HNF4 α -Expression einen mesenchymal-epithelialen Übergang auslöst (Parviz et al. 2003). Weiterhin führt die Expression von HNF4 α in murinen Hepatomazellen (fgHCC-H33 Zellen) zu einem epithelialen Phänotyp (Lazarevich et al. 2004). Darüber hinaus zeigte der spezifische Knockout von HNF4 α in fetalen Hepatozyten, dass HNF4 α für die Bildung eines hepatischen Epitheliums essentiell ist (Lazarevich et al. 2004).

In allen publizierten Studien wurde eine Induktion der epithelialen Morphologie nach HNF4 α -Expression nachgewiesen. Im Gegensatz dazu löste die Expression von HNF4 α in HEK293 Zellen den Verlust der epithel-ähnlichen Morphologie aus. Diese unterschiedliche Wirkung in den verschiedenen Zelllinien könnte auf einen zellspezifischen Effekt von HNF4 α zurückzuführen sein. Es ist möglich, dass HNF4 α in Nierenzellen eine andere morphologische Funktion als in den Leberzellen ausübt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass der Effekt von HNF4 α auf die Morphologie isoformspezifisch ist, da in allen publizierten Studien die Isoform HNF4 α 1 eingesetzt wurde, während in dieser Arbeit die Isoform HNF4 α 2 verwendet wurde.

Tab. IV.1: Durch HNF4 α regulierte Gene, die Komponenten der Zell-Zell-Verbindungen darstellen.

Referenz	Zelllinie (Organismus)	Komponenten von	Gen
Späth and Weiss 1998	Hepatomazellen H5 (Ratte)	Intermediärfilamenten Adherens Junctions Tight Junctions	Cytokeratin E-cadherin ZO-1
Chiba et al 2003	embryonale Karzinomzellen F9 (Maus)	Tight Junctions	occludin, claudin-6, claudin-7, ZO-1*, ZO-2*, E-cadherin*, β -catenin*
Parviz et al 2003	HNF4 α Knockout-Maus in der Leber	Tight Junctions Adherens Junctions Gap Junctions Adhäsionsprotein	ZO-1* E-cadherin connexin 26, connexin 32 CEACAM1

Die Expression der mit Asteriskus markierten Gene wurde durch HNF4 α nicht induziert. Bei diesen Genen veränderte sich nach HNF4 α -Expression die Zelllokalisierung der korrespondierenden Proteine.

In der Tabelle IV.1 sind die publizierten HNF4 α -regulierten Gene aufgeführt, die Komponenten der Zell-Zell-Verbindungen darstellen. Keines dieser Gene wurde als HNF4 α -reguliertes Gen in den HEK293 Zellen identifiziert.

Da in mehreren der publizierten Studien festgestellt wurde, dass HNF4 α den epithelialen Genmarker E-cadherin induziert, wurde in dieser Arbeit überprüft, ob HNF4 α ebenfalls die Expression dieses Gens in HEK293 Zellen reguliert (Daten nicht gezeigt). In der Mikroarray-Analyse wurde E-cadherin als nicht vorhanden detektiert. Die Untersuchung mehrerer unabhängigen Proben mittels Real-time PCR belegte, dass HNF4 α die Expression von E-cadherin in HEK293 Zellen nicht beeinflusst. Anhand dieses Ergebnisses wird deutlich, dass die von HNF4 α regulierten Adhäsionsproteine in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich sind.

Die beobachteten morphologischen Veränderungen in HEK293 Zellen könnten auf eine Veränderung der Zellkontakte zurückzuführen sein. Man kann annehmen, dass nach HNF4 α -Expression eine Abnahme der Zell-Substrat-Wechselwirkungen und eine Zunahme der Zell-Zell-Kontakte stattfinden, die den runden Phänotyp und die Bildung dreidimensionaler Aggregate induzieren. In der Mikroarray-Analyse waren mehrere Gene, die Adhäsionsmoleküle kodieren (COL21A, PKP2, DSC2 und CSPG2), nach HNF4 α -Expression induziert. Man kann spekulieren, dass die positive Regulation dieser Gene zu einer Verstärkung der Zell-Zell Adhäsion führen könnte. Nach HNF4 α -Expression ist auch eine Reihe von Genen, die Zytoskelettproteine kodieren, positiv reguliert. Dabei zeigt das VIL1-Gen die höchste Regulation. Villin 1 (VIL1) ist ein Mitglied der Gelsolin-Superfamilie, die die Aktinfilamente durch Quervernetzung umformen. Ein Umbau des Aktinzytoskeletts könnte auch für die beobachtete Veränderung der Morphologie verantwortlich sein.

4 Die von HNF4 α hervorgerufenen Effekte erfolgen über die Aktivierung von HNF4 α -Zielgenen

Da HNF4 α ein Transkriptionsfaktor ist, war es naheliegend, dass HNF4 α seine proliferationshemmende Funktion wahrscheinlich durch die Regulation der Expression von spezifischen Zielgenen ausübt. Dennoch gibt es Transkriptionsfaktoren, die die Proliferation nicht über die Aktivierung von Zielgenen, sondern durch Interaktion mit Zellzyklusproteinen

beeinflussen. Der Transkriptionsfaktor C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein alpha), welcher wie HNF4 α in der Leber angereichert ist, vermittelt die Inhibierung der Proliferation durch direkte Interaktion mit den Zellzyklusproteinen Cdk2, Cdk4, pRB, E2F und Brm (Iakova et al. 2003; Wang et al. 2001; Wang et al. 2002). Der Transkriptionsfaktor MyoD (myoblast determination protein) inhibiert ebenfalls die Proliferation durch Interaktion mit Cdk4 (Zhang et al. 1999).

Die Effekte von HNF4 α in HEK293 Zellen finden aber nicht über eine Interaktion mit einem anderen Protein statt, da die durchgeführten Experimente belegten, dass die HNF4 α Mutante C106R, die keine DNA bindet aber die ganze Proteinsequenz enthält (Taylor et al. 1996), die Zellvermehrung nicht beeinflusst. Somit ist die transkriptionelle Aktivität von HNF4 α für die Vermittlung der Proliferationshemmung essentiell. Eine Interaktion mit einem anderen Protein kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden, da es die Möglichkeit besteht, dass für die Interaktion von HNF4 α mit einem anderen Protein eine intakte Struktur der DNA-Bindungsdomäne notwendig ist, die bei der Mutante C106R nicht vorhanden ist.

Da die HNF4 α -Mutante C106R keinen Einfluss auf die Proliferation hat, kann man ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen, dass HNF4 α die Proliferation durch Regulation der Transkription über einen DNA-unabhängigen Mechanismus beeinflusst. Ein Beispiel für eine solche Regulation stellt der Glukokortikoidrezeptor dar, der wie HNF4 α zu der Nuklearrezeptor-Familie gehört. Dieser Transkriptionsfaktor kann durch direkte Bindung an die DNA oder durch Bindung an andere Transkriptionsfaktoren die Genexpression regulieren (Tronche et al. 1998).

5 HNF4 α -regulierte Gene in HEK293 Zellen

Zur Identifizierung der Gene, die durch HNF4 α reguliert werden, wurden die Genexpressionsmuster der induzierten und nicht induzierten HNF4 α -Zelllinien verglichen. Für die Analyse der Genexpression wurde der Affymetrix Genechip Human Genome HG-U133A eingesetzt. Dieser Genechip detektiert ca. 18.400 Transkripte, von denen 14.500 gut charakterisierte Gene sind. Der Chip stellt mehr als die Hälfte des humanen Genoms dar, welches 20.000-25.000 proteinkodierende Gene enthält (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). Die vergleichende Analyse des Genexpressionsprofils in den induzierten mit den nicht induzierten Zellen lieferte bei den verwendeten Filterbedingungen

(2-fache Aktivierung) in jeder HNF4 α -wt Zelllinie etwa 250 Gene, die nach 24 Std. reguliert waren. Aber nur 65 Gene wurden durch die Überexpression von HNF4 α in beiden unabhängigen Zelllinien nach 24 Std. Induktion gleichzeitig differentiell exprimiert (s. Tab. III.2). Offensichtlich bestanden zelllinienspezifische Unterschiede, obwohl der Integrationsort in allen Zellen identisch sein sollte.

Die Mehrheit der identifizierten Gene war hochreguliert, so dass HNF4 α hauptsächlich eine positive Regulation der Transkription induziert. Diese Wirkung als positiver Regulator wurde auch in früheren Mikroarray-Studien in Hepatomazellen (Naiki et al. 2002) und zu einem niedrigeren Ausmaß auch in pankreatischen β -Zellen festgestellt (Thomas et al. 2004).

Die durchgeführte Mikroarray-Analyse ist die erste, die die HNF4 α -regulierten Gene in Nierenzellen untersucht. Die meisten identifizierten Gene stellen neue HNF4 α -regulierte Gene dar, die in den vorigen Studien nicht erfasst wurden. Dies widerspiegelt die Tatsache, dass die meisten HNF4 α -Zielgene bisher in Hepatozyten oder β -Zellen des Pankreas identifiziert wurden (Sladek and Seidel 2001). Die 65 Gene, die in den HEK293 Zellen nach 24 Std. HNF4 α -Induktion differentiell exprimiert werden (Tab. III.4), wurden mit den in der Literatur vorhandenen Daten über HNF4 α -regulierte Gene (s. Tab. I.2 und I.3) verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass es keine Übereinstimmung mit älteren Studien und nur eine geringe Übereinstimmung mit den in den letzten Jahren erschienenen Mikroarray-Analysen bestand. Der Vergleich mit den 62 Genen aus der Mikroarray-Analyse in der humanen Hepatoma-Zelllinie HuH-7 (Naiki et al. 2002) zeigte, dass nur ein Gen, das ACY1 (Aminoacylase 1), in beiden Studien durch HNF4 α reguliert wird. Der Vergleich mit den 338 Sondensätzen aus der Mikroarray-Analyse in pankreatischen β -Zellen (Thomas et al. 2004) ergab, dass nur die vier Gene ACY1, ERBB3, ETFDH und SLC25A20 in beiden Studien gleichzeitig reguliert werden. In beiden Mikroarray-Studien waren die gemeinsamen Gene auf der gleichen Weise wie in den HEK293 Zellen hochreguliert. Odom et al identifizierten durch den Einsatz einer Kombination aus Chromatin-Immunopräzipitation und Promotor-Mikroarray 1575 Gene in Hepatozyten und 1423 Gene in pankreatischen Zellen deren Promotoren von HNF4 α gebunden werden (Odom et al. 2004). Der Vergleich dieser Gene mit den identifizierten HNF4 α -Zielgenen in den HEK293 Zellen ergab, dass nur 13 der von Odom et al identifizierten Gene durch HNF4 α in HEK293 Zellen reguliert werden (Tab. IV.2).

Tab. IV.2: Gene, die in HEK293 Zellen und in früheren Mikroarray-Studien als HNF4 α -regulierte Gene identifiziert wurden.

Referenz	Zellen	Gensymbol
Naiki et al 2002	Hepatoma-Zelllinie (HuH-7)	ACY1
Thomas et al 2004	Insulinoma-Zelllinie (INS-1)	ACY1, ERBB3, ETFDH, SLC25A20
Odom et al 2004	Hepatozyten	ACADVL, ACX1, ACY1, AGXT2L1, ALDH5A1, ERBB3, HEY1, LOC57228, MGST2, MPP1, RBSK
Odom et al 2004	pankreatische Inselzellen	ACOX1, GAS1

Die geringe Übereinstimmung mit den Mikroarray-Studien, die in anderen Zelltypen durchgeführt wurden, beweist, dass HNF4 α als gewebespezifischer Transkriptionsfaktor die Genaktivitäten auf einer zellspezifischen Weise beeinflusst.

5.1 Bestätigung der potentiell durch HNF4 α induzierter Gene

Obwohl bei der Microarray-Analyse zwei unabhängige HNF4 α wt Zelllinien analysiert wurden, wurde die Analyse nur einmal durchgeführt, so dass falsch-positive Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden konnten. Somit gaben die Resultate des Mikroarrays Hinweise auf die Regulation bestimmter Gene durch HNF4 α , diese mussten jedoch durch eine weitere unabhängige Methode überprüft werden. Für die Validierung der Mikroarray-Daten wurde die Real-time PCR eingesetzt. Die Induktion von 82 identifizierten HNF4 α -Zielgenen wurde überprüft. Hierbei wurde die regulierte Expression bei 69 von den 82 analysierten Genen bestätigt. Diese hohe Validierung erhärtet die erhaltenen Daten in der Mikroarray-Analyse. Die Induktion der Gene WT1 und Villin wurde ebenfalls mittels Western Blot auf Proteinebene validiert. Dies deutet darauf hin, dass bei der Mehrheit der Gene die gemessene Veränderung auf der RNA-Ebene sich wahrscheinlich auf der Proteinebene widerspiegelt.

5.2 Mehrere Gene, die durch HNF4 α in HEK293 Zellen reguliert werden, sind im Nierenzellkarzinom dereguliert

Die 13 identifizierten HNF4 α -Zielgene ACY1, WT1, SELENBP1, COBL, EFHD1, AGXT2L1, ALDH5A1, THEM2, ABCB1, FLJ14146, CSPG2, TRIM9 und HEY1 (s. Tab. III.8) sind im NZK genau in der umgekehrten Richtung wie in HNF4 α -exprimierenden HEK293 Zellen reguliert. Dieser Befund weist darauf hin, dass die Regulation dieser Gene im NZK durch die verminderte HNF4 α -Expression stattfinden könnte.

Bemerkenswert ist, dass das Gen ACY1 (Aminoacylase) in allen publizierten Mikroarray-Studien über HNF4 α -Zielgene als HNF4 α -reguliertes Gen identifiziert wurde, was die Signifikanz dieses Gens als HNF4 α -Zielgen bekräftigt (s. Tab. IV.2). Darüber hinaus ist ACY1 nicht nur auf RNA-Ebene (Lenburg et al. 2003; Liou et al. 2004), sondern auch auf Proteinebene (Balabanov et al. 2001) im NZK herunterreguliert. Die Aminoacylase ist an Entgiftungsprozesse beteiligt. Interessanterweise fördert eine Inaktivierung von ACY-1 das Zellwachstum, und eine reduzierte Expression dieses Enzyms wurde ebenfalls in kleinzelligen Bronchialkarzinomen festgestellt (Cook et al. 1998). Als Zielgen von HNF4 α in vielen Zelltypen und aufgrund dessen verminderten Expression in verschiedenen Tumoren könnte ACY1 für die Vermittlung der Tumorsuppressorfunktion von HNF4 α wichtig sein.

Unter den identifizierten HNF4 α -Zielgenen, die im NZK dereguliert sind, befindet sich auch das Gen SELENBP1 (selenium binding protein 1). Eine verminderte Expression des SELENBP1-Transkriptes wurde in mehreren publizierten Mikroarray-Studien des NZKs belegt (Boer et al. 2001; Higgins et al. 2004). SELENBP1 ist ebenfalls im Lungenadenokarzinom und im Adenokarzinom des Magens herunterreguliert (Chen et al. 2004; He et al. 2004), so dass dieses Gen an der Tumorentstehung beteiligt sein könnte.

5.3 HNF4 α C106R- und HNF4 α R154X-regulierte Gene

Die Analyse der HNF4 α C106R-regulierten Gene mittels Mikroarray und Real-time PCR zeigte, dass diese Mutante fast keine Gene aktiviert. Da die C106R-Mutante keine DNA bindet, sollten nur Gene, die aufgrund der Tetracyclin-Behandlung oder durch Protein-Protein-Interaktionen reguliert werden, nach HNF4 α C106R-Expression differentiell exprimiert werden. Die Datenanalyse der Ergebnisse mit den ausgewählten Filterbedingungen ergab nur ein HNF4 α C106R-reguliertes Gen, das DDX17-Gen. Aber da das DDX17-Gen von HNF4 α wt nicht reguliert wurde, kann ausgeschlossen werden, dass dieses Gen durch HNF4 α wt mittels eines DNA-unabhängigen Mechanismus reguliert wird.

Die Analyse der HNF4 α R154X-regulierten Gene mittels Mikroarray zeigte, dass diese Mutante nur das Gen LOC492304 (putative insulin-like growth factor II associated protein) induziert. In der Literatur wurde ebenfalls beschrieben, dass diese Mutante eine sehr geringe bzw. keine Aktivität aufweist (Laine et al. 2000; Lausen et al. 2000).

Die geringe Anzahl der durch beide Mutanten regulierten Gene beweist, dass die Tetracyclin-Behandlung und die Überexpression nicht zu einer unspezifischen Regulation von Genen in HEK293 Zellen führen.

6 Kandidatengene für die Vermittlung der HNF4 α -Effekte

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die Gene zu identifizieren, die die Effekte von HNF4 α auf die Zellproliferation und Morphologie vermitteln. Diese Identifizierung würde weitere Einblicke in den Mechanismus der proliferationshemmenden Wirkung von HNF4 α geben.

Bei dem identifizierten HNF4 α -Zielgen WT1 (Wilms tumor 1) handelt es sich um ein interessantes Kandidatengen, das zu der Verringerung der Proliferation beitragen könnte. Der Effekt von WT1 auf die Proliferation ist gut dokumentiert, aber scheint sehr komplex zu sein, da sowohl positive als auch negative Effekte von WT1 auf das Wachstum berichtet wurden (Wagner et al. 2003). In diesem Kontext ist interessant zu erwähnen, dass WT1 HNF4 α in Hepatozyten herunterreguliert (Berasain et al. 2003), was auf eine negative Rückkopplung zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren hinweist. Drei weitere HNF4 α -Zielgene, die mit der Proliferation ebenfalls in Zusammenhang stehen, sind MTM1, SELENBP1 und SEPP1.

Unter den identifizierten HNF4 α -regulierten Genen befinden sich auch Gene, deren Funktion mit der Proliferation in Zusammenhang steht, aber als Kandidatengene für die HNF4 α -Effekte ausgeschlossen werden können. Bei dem HNF4 α -Zielgen GAS1 (growth arrest specific 1) handelt es sich um einen Zell-Zyklus-Regulator, welcher die Zellproliferation hemmt (Del Sal et al. 1994). Dennoch kann das GAS1-Gen nicht für die Hemmung der Proliferation zuständig sein, da die GAS1-Expression vermindert ist. Darüber hinaus wurden drei HNF4 α -Zielgene identifiziert, die Komponenten der Apoptoseinduktion darstellen: TRAF4, CFLAR und BIRC2. Jedoch gab es keine Evidenz einer Apoptoseinduktion durch HNF4 α , so dass angenommen werden kann, dass diese Veränderungen für eine Aktivierung der Apoptose nicht genügend sind.

Kandidatengene für die beobachteten morphologischen Veränderungen sind die HNF4 α -Zielgene, die Komponenten des Zytoskeletts oder Zelladhäsionsproteine kodieren. Die Unterschiede in der Expression dieser Gene könnten ebenfalls auf einer indirekten Weise auf die Proliferation wirken. Ein interessantes Kandidatengen für die Veränderung der Morphologie stellt das Gen VIL1 (Villin 1) dar. Villin 1 ist ein Mitglied der Gelsolin-Superfamilie, welches das Zytoskelett durch die Trennung der Aktinfilamente remodelliert (Silacci et al. 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die 6 Gene WT1, VIL1, DSC2, MTM1, SEPP1 und SELENBP1 als Kandidaten für die Vermittlung der Effekte von HNF4 α ausgewählt. Um die Bedeutung dieser Gene für die Kontrolle der Proliferation und Zellmorphologie zu

untersuchen, wurden diese zunächst in HEK293 Zellen stabil transfiziert. Da die korrekte cDNA für die Gene VIL1 und SELENBP1 nicht zur Verfügung stand, konnten diese zwei Gene nicht durch Überexpression untersucht werden. Bei den Genen WT1, DSC2, MTM1 und SEPP1 führte die Überexpression in den HEK293 Zellen zu keiner Veränderung der Zellproliferation oder Morphologie. Somit haben diese Gene keine Hauptmitwirkung in der Vermittlung der Effekte von HNF4 α . Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass diese Gene zusammen mit anderen Genaktivitäten für die HNF4 α -Effekte essentiell sind. Der große Nachteil der Überexpressionsexperimente ist der große Zeitaufwand. Um innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl von Genen auf ihre Funktionalität zu testen, wurde die RNA-Interferenz (RNAi) eingesetzt. Angewandt wurde eine transiente und stabile Transfektion von siRNA-Kassetten, um die Inaktivierung der Kandidatengene zu erzielen. Diese Methoden führten jedoch zu keiner wirksamen Reduktion der Expression der Kandidatengene. Somit konnte die siRNA-Technik nicht verwendet werden, um die HNF4 α -Zielgene zu erfassen, die die HNF4 α -Effekte vermitteln.

7 HNF4 α und MODY

Beim Menschen führt die Mutation des HNF4 α -Gens zu MODY1, einer vererbten Form von Diabetes, der auf einer gestörten Insulinsekretion der β -Zellen beruht, aber erst nach Jahrzehnten manifest wird. Die in der vorliegenden Arbeit bewiesene proliferationshemmende Wirkung von HNF4 α könnte den späten Ausbruch der MODY1 Krankheit erklären. Die MODY1-Patienten, die mit einem mutierten HNF4 α -Allel geboren werden, zeigen bei der Geburt keine Defekte im Glucose-Stoffwechsel, sondern in der Regel erst in einem Alter von 10 bis 40 Jahren (Frayling et al. 2001). Um diesen späten Phänotyp zu erklären, kann man spekulieren, dass durch somatische Mutationen oder durch epigenetische Mechanismen das intakte wt HNF4 α -Allel in den β -Zellen des Pankreas inaktiviert wird. Diese Zellen entziehen sich so der Wachstumskontrolle durch HNF4 α und überwachsen mit der Zeit die Zellen, die HNF4 α exprimieren. Da HNF4 α an der Regulation der Insulin-Expression sowie des Glukosetransportes und –metabolismus beteiligt ist (Bartoov-Shifman et al. 2002; Wang et al. 2000), wird durch die Zunahme an HNF4 α -negativen β -Zellen im Verlaufe der Zeit eine Unterfunktion der β -Zellpopulation auftreten, die sich als Diabetes manifestiert.

8 Beteiligung von HNF4 α an der Entwicklung des Nierenzellkarzinoms

In Arbeiten aus unserem Labor wurde gezeigt, dass in menschlichen Nierenzellkarzinomen die Funktion von HNF4 α häufig gestört ist (Sel et al. 1996). Dieser Befund deutete zum ersten Mal darauf hin, dass HNF4 α eine Rolle bei der Entwicklung des Nierenzellkarzinoms spielen könnte. Mit der Verfügbarkeit der DNA-Mikroarray-Technologie wurde systematisch das Genexpressionsprofil im NZK analysiert (Boer et al. 2001; Giese et al. 2002; Higgins et al. 2004; Takahashi et al. 2003; Young et al. 2001). Jedoch wurde eine differentielle HNF4 α -Expression in den meisten Studien nicht gemessen, weil möglicherweise die angewandten Methoden für Transkripte mit einer geringen Abundanz nicht sensitiv genug waren. Eine bemerkenswerte Ausnahme stellte die Lenburg et al Studie dar, die mittels einer genomweiten Mikroarray-Analyse (45.000 Sondensätze) 1.234 Gene identifizierte, die im NZK im Vergleich zu normalem Nierengewebe mehr als dreifach induziert bzw. vermindert sind (Lenburg et al. 2003). Unter diesen Genen befand sich auch das HNF4 α -Gen, dessen Expression um den Faktor 4,7-fach vermindert war. Die Herunterregulation von HNF4 α im NZK auf RNA- (Lenburg et al. 2003) und Protein-Ebene (Sel et al. 1996) deuten auf eine mögliche Tumorsuppressorfunktion des HNF4 α -Gens im NZK hin.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass HNF4 α eine antiproliferative Wirkung in Nierenzellen ausübt. In vor kurzem erschienenen Studien wurde ebenfalls eine proliferationshemmende Funktion von HNF4 α in anderen Zelltypen demonstriert (Chiba et al. 2005; Lazarevich et al. 2004). Diese Ergebnisse verstärken die Hypothese, dass HNF4 α als Tumorsuppressor agiert, da die inhibitorische Wirkung auf die Zellproliferation eine zu erwartende Eigenschaft eines Tumorsuppressor ist. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass 13 von den 65 identifizierten HNF4 α -Zielgenen im NZK genau in der umgekehrten Richtung wie in HEK293 Zellen reguliert sind. Dieser Befund beweist, dass die Reduktion von HNF4 α im NZK zur Deregulation von HNF4 α -Zielgenen führt und stellt ein Hinweis für eine Beteiligung von HNF4 α an den transkriptionellen Veränderungen im NZK dar.

Verschiedene Studien, die in den letzten Jahren publiziert worden sind, deuten auch darauf hin, dass HNF4 α im Nierenzellkarzinom eine wichtige Rolle spielen könnte. HNF4 α weist im hepatozellulären Karzinom (HCC) ein verringertes Expressionsniveau auf (Choi et al. 2004) und spielt in der Progression des HCCs eine wichtige Rolle (Ishiyama et al. 2003; Lazarevich

et al. 2004). Demnach könnte HNF4 α ein Tumorsuppressor im hepatozellulären Karzinom sein. Man kann spekulieren, dass HNF4 α in allen Geweben, wo es exprimiert wird, als Tumorsuppressor agiert. Weiterhin wurden in einer vor kurzem erschienenen Veröffentlichung die biallelische Inaktivierung des HNF1 β -Gens und die monoallelische Mutation von HNF1 α in Nierenzellkarzinomen nachgewiesen (Rebouissou et al. 2005). Die Tatsache, dass die Gene HNF1 β und HNF1 α , die mit HNF4 α über einen Regulationsnetzwerk aus Transkriptionsfaktoren in Verbindung stehen (Ferrer 2002; Thomas et al. 2001) (s. Abb. I.3), eine Rolle im NZK spielen, weist ebenfalls auf eine Beteiligung des HNF4 α -Gens an der NZK-Tumorgenese hin.

Darüber hinaus stellen mehrere Eigenschaften des Nierenzellkarzinoms Hinweise dafür, dass eine verminderte HNF4 α -Expression zur Tumorentstehung beitragen könnte. Das Expressionsniveau vieler Gene, die am Transport beteiligt sind, ist im NZK verringert (Liou et al. 2004). Da HNF4 α in der Leber als auch in den HEK293 Zellen viele am Transport beteiligten Gene reguliert, ergibt sich die Hypothese, dass die Unterschiede in der Expression dieser Gene im NZK von HNF4 α ausgelöst werden. Darüber hinaus ist das klarzellige NZK reichlich an Lipiden und Cholesterol (Gebhard et al. 1987), was auf eine Störung des Lipidmetabolismus oder der Lipidhomeostase hindeutet. Da HNF4 α diese Prozesse in der Leber reguliert, besteht die Möglichkeit, dass HNF4 α diese Prozesse ebenfalls in der Niere reguliert, so dass eine Abnahme des HNF4 α -Proteins zu einer gestörten Lipidkonzentration führen würde. Ein weiterer interessanter Aspekt stellt die Beteiligung des Transkriptionsfaktors HIF (hypoxia inducible factor) an der Tumorgenese des NZKs. Da HNF4 α zusammen mit HIF die Gene EPO (Huang et al. 1997; Sanchez-Elsner et al. 2004) und Glukokinase (Roth et al. 2004) reguliert, könnte HNF4 α zusammen mit HIF für die Tumorentstehung wichtig sein. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass HNF4 α innerhalb der Niere nur in den proximalen tubulären Epithelzellen, welche die Vorläuferzellen des klarzelligen NZKs darstellen (Kovacs et al. 1997), reichlich exprimiert wird (Chabardes-Garonne et al. 2003; Jiang et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde bewiesen, dass HNF4 α die Zellmorphologie verändert und dass mehrere Zelladhäsionsproteine durch HNF4 α induziert werden. Daher kann man spekulieren, dass der Verlust der HNF4 α -Expression in Nierenzellkarzinomen die Zell-Zell Adhäsion in den Nierenzellen so verändert, dass eine Metastasierung der Tumorzellen erleichtert wird. Das E-Cadherin, welches eine ähnliche morphologische Veränderung wie

HNF4 α hervorruft, spielt eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung zahlreicher Tumorarten (Hazan et al. 2004).

Wenn HNF4 α als ein Tumorsuppressor in Nierenzellen funktioniert, dann könnte die Verminderung dessen Expression und Aktivität durch Mutationen stattfinden. Bei der Suche nach Mutationen im humanen HNF4 α -Gen in verschiedenen Tumorzelllinien wurde nur eine Missense-Mutation in der Hepatoma-Zelllinie HepG2 festgestellt (Lausen et al. 2000). Dennoch ist es nicht klar, ob diese Mutation ein verursachendes Ereignis in der Entwicklung des Hepatomas war. In humanen Tumoren wurden bisher keine tumorassoziierte Mutationen im HNF4 α -Gen entdeckt (persönliche Mitteilung: Prof. G.U. Ryffel, Institut für Zellbiologie, Essen). Nach der Zwei-Treffer-Hypothese (Knudson, Jr. 1971) müssen zwei unabhängige Mutationen in beiden Allelen eines Tumorsuppressorgens stattfinden, damit dieses nicht mehr aktiv ist. Aus diesem Grund sollten die MODY1-Patienten, bei denen bereits ein HNF4 α -Allel in der Keimbahn mutiert ist, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an NZK leiden. Allerdings gibt es aus der bisherigen Literatur keine eindeutigen Daten über diese Vermutung. Epigenetische Mechanismen und nicht Mutationen spielen wahrscheinlich bei der Inaktivierung von HNF4 α im NZK eine wichtige Rolle. Ein Beispiel für ein Gen, welches durch epigenetische Phänomene im NZK herunterreguliert wird, stellt das Tumorsuppressorgen VHL (von Hippel-Lindau tumor suppressor) dar. Dieses Gen, das an der Tumorgenese des NZK beteiligt ist, wird sowohl durch Mutationen (Gnarra et al 1994) als auch durch DNA-Methylierung (Herman et al 1994) inaktiviert.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann folgendes Modell für den Mechanismus der Entstehung des Nierenzellkarzinoms aufgestellt werden (Abb. IV.1): Aufgrund von Mutationen oder epigenetischen Phänomenen wird das HNF4 α -Gen in einer Nierenzelle inaktiviert. Dieses Ereignis führt zum Verlust der antiproliferativen Wirkung von HNF4 α und somit zur gesteigerten Proliferation dieser Zelle. Mit der Zeit überwächst diese Zelle die Zellen, die HNF4 α exprimieren. Darüber hinaus verändert sich in den HNF4 α -negativen Zellen die Zell-Zell Adhäsion, so dass eine Invasion und Metastasierung begünstigt wird. Somit würde die Inaktivierung von HNF4 α einen wichtigen Schritt in der Entstehung und Metastasierung des NZKs darstellen.

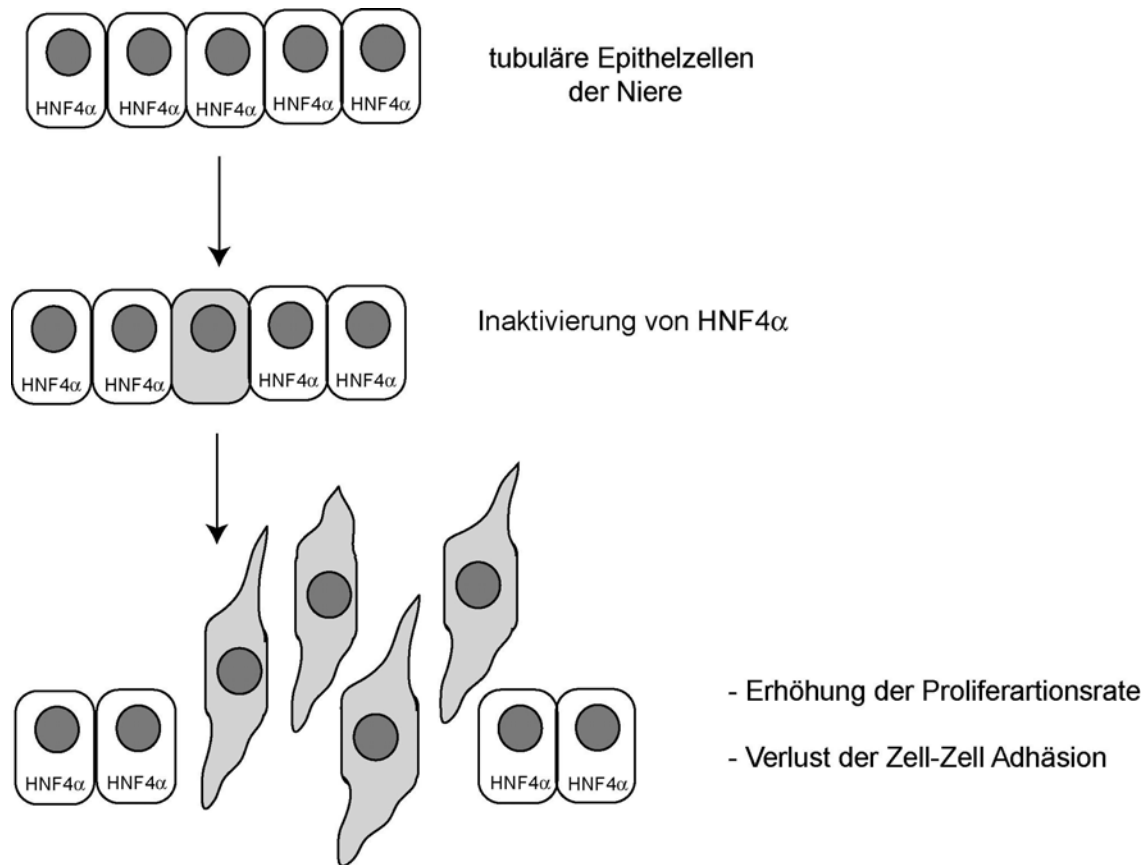


Abb. IV.1: Modell für die Beteiligung von HNF4α an der Tumorgenese des Nierenzellkarzinoms. Aufgrund von Mutationen oder epigenetischen Mechanismen wird das HNF4α-Gen in einer der tubulären Epithelzellen der Niere inaktiviert. In dieser Zelle findet die proliferationshemmende Wirkung von HNF4α nicht mehr statt, so dass die HNF4α-negative Zelle mit der Zeit die Zellen, die HNF4α exprimieren, überwächst. Die Inaktivierung von HNF4α führt ebenfalls zu einer veränderten Zelladhäsion mit den anderen tubulären Epithelzellen und mit dem Stroma, so dass die HNF4α-negativen Zellen metastasieren können.

9 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit belegte die Überexpression der Kandidatengene WT1, MTM1, SEPP1 und DSC2, dass diese Gene den proliferationshemmenden Effekt von HNF4α nicht vermitteln. Offen bleibt jedoch, welche HNF4α-Zielgene die antiproliferative Funktion von HNF4α ausüben. Bei der weiteren zukünftigen Suche nach den verantwortlichen Genen sollte berücksichtigt werden, dass in der durchgeführten Mikroarray-Analyse nur 15.000 von den etwa 20.000-25.000 proteinkodierenden Genen des humanen Genoms analysiert wurden. Es besteht die Möglichkeit, dass das Gen, welches den HNF4α-Effekt vermittelt, in den restlichen etwa 10.000 nicht analysierten Genen sich befindet. Bei der Suche nach den verantwortlichen HNF4α-Zielgenen ist ebenfalls zu beachten, dass der Effekt von HNF4α eventuell durch die Regulation mehrerer Gene ausgeübt wird. In diesem Fall würde die

Überexpression oder Herunterregulation eines einzelnen verantwortlichen Gens keine Wirkung auf die Zellproliferation und Morphologie haben. Aufgrund der hohen Anzahl von Genen, die durch HNF4 α reguliert werden, ist die Untersuchung des Beitrages von einzelnen Genen eine sehr aufwendige Aufgabe, die sehr viel Zeit in Anspruch nimmt. Ein Screen-Verfahren, z.B. durch den Einsatz einer „siRNA-Library“, könnte innerhalb einer kürzeren Zeit zur Ermittlung der verantwortlichen HNF4 α -Zielgene führen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine potentielle Tumorsuppressorfunktion des HNF4 α -Gens im Nierenzellkarzinom hin. Jedoch sollten weitere *in vivo* und *in vitro* Experimente durchgeführt werden, um diese Funktion zu bestätigen.

Hierbei könnte untersucht werden, ob die HNF4 α -Expression die Malignität von Zellen vermindert. Die Analyse, ob die HNF4 α -exprimierenden Zellen Kolonien im Weichagar bilden oder ohne Zusätze von Wachstumsfaktoren im Kulturmedium wachsen, könnte aufklären, ob HNF4 α die maligne Transformation von Zellen vermindern kann. Darüber hinaus könnte durch die Injektion von HNF4 α -exprimierenden Zellen in die Nacktmaus *in vivo* untersucht werden, ob HNF4 α eine Reduktion des Tumorwachstums auslöst. Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass viele Ergebnisse aus Tiermodellen nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind (Knudson 1993).

Die Analyse, ob spezifische Variationen des HNF4 α -Proteins, die mit MODY1 (Ryffel 2001) assoziiert sind, zu NZK prädisponieren, könnte aufschlussreich sein. Da gezeigt worden ist, dass die Rate von Nierenzellkarzinomen in Diabetes-Patienten allgemein erhöht ist (Lindblad et al. 1999), wäre ebenfalls interessant zu analysieren, ob die SNPs (single nucleotide polymorphisms) im HNF4 α -Gen, die mit dem allgemeinen Typ2 Diabetes assoziiert sind (Love-Gregory et al. 2004; Silander et al. 2004; Weedon et al. 2004), zu NZK prädisponieren.

V Zusammenfassung

Der zellspezifische Transkriptionsfaktor HNF4 α ist für die transkriptionelle Kontrolle von Genen wichtig, die in der Leber, der Niere, dem Magen-Darmtrakt und den β -Zellen des Pankreas exprimiert werden. Die Funktion von HNF4 α wurde bis jetzt hauptsächlich in Leberzellen, in β -Zellen des Pankreas und in embryonalen Stammzellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass HNF4 α eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung, beim Stoffwechsel und beim Nährstofftransport spielt. Obwohl HNF4 α in der Niere exprimiert wird, sind die Funktion und die Zielgene von HNF4 α in diesem Organ noch unbekannt. Da ein Funktionsausfall von HNF4 α bei Nierenzellkarzinomen beschrieben worden ist, besteht die Möglichkeit, dass HNF4 α als Tumorsuppressor in Nierenzellen agiert. Die Erforschung der HNF4 α -Funktion und der HNF4 α -Zielgene in Nierenzellen ist daher ein wichtiges Ziel, um aufzuklären, ob HNF4 α eine Tumorsuppressorfunktion im Nierenzellkarzinom hat.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst humane embryonale Nierenzellen (HEK293) etabliert, die HNF4 α wt in einer induzierbaren Form exprimieren. Dafür wurde die Flp-In T-REx 293 Zelllinie eingesetzt, mit der die Gene durch Flp-vermittelte Rekombination in die Zellen stabil transfiziert werden. Als Negativkontrolle wurden die HNF4 α -Mutanten R154X und C106R, die eine sehr geringe bzw. keine Aktivität aufweisen, in die Zellen eingebracht. Die etablierten Zellen zeigten eine sehr effiziente induzierbare Expression und wurden somit in den Experimenten zur Analyse der HNF4 α -Funktion eingesetzt.

Es zeigte sich, dass die Expression von HNF4 α wt in HEK293 Zellen zu einer verzögerten Zellproliferation führte. Der proliferationshemmende Effekt war spezifisch auf die Expression von HNF4 α zurückzuführen, da die Expression der HNF4 α -Mutanten die Zellvermehrung nicht beeinträchtigte. Zum ersten Mal wurde damit gezeigt, dass HNF4 α die Zellproliferation von Nierenzellen hemmt. Weiterhin wurde festgestellt, dass die antiproliferative Wirkung von HNF4 α nicht auf eine Veränderung der Zellzyklusverteilung oder auf eine Induktion von Apoptose zurückzuführen war. Die Verringerung der Proliferation nach HNF4 α -Expression war von einer Veränderung der Zellmorphologie begleitet. Es konnte belegt werden, dass sowohl die Verringerung der Proliferation als auch die morphologischen Veränderungen, die durch HNF4 α hervorgerufen wurden, reversibel waren. Ferner wurde eine Abhängigkeit der Effekte vom HNF4 α -Proteinniveau nachgewiesen. Dabei führte eine physiologische HNF4 α -Konzentration zu einer signifikanten Verringerung der Zellvermehrung.

Eine Auslösung der HNF4 α -Effekte durch eine Interaktion mit einem anderen Protein konnte ausgeschlossen werden. Somit beeinflusst HNF4 α die Proliferation und die Zellmorphologie höchstwahrscheinlich durch die Regulation der Expression von spezifischen Zielgenen. Um die Gene zu erfassen, deren Aktivität durch HNF4 α in den HEK293 Zellen spezifisch verändert wird, wurde mittels Mikroarray-Analyse ein Genexpressionsvergleich zwischen den nicht induzierten und den induzierten HNF4 α -Zelllinien durchgeführt. Eine Vielzahl neuer HNF4 α -regulierter Gene wurde identifiziert. Die verwendeten Filterbedingungen zur Datenanalyse ergaben 65 Gene, die nach 24 Stunden HNF4 α -Induktion in den HEK293 Zellen reguliert waren. Die identifizierten HNF4 α -Zielgene sind an vielen verschiedenen Prozessen involviert. Die differentielle Expression ausgewählter Kandidatengene wurde mittels Real-time PCR überprüft. Dabei wurden von insgesamt 82 analysierten Genen 69 bestätigt. Darüber hinaus wurde die Regulation der Gene WT1 und VIL1 ebenfalls auf Proteinebene validiert. Die hohe Validierung bekräftigte die Bedeutung der erhaltenen Mikroarray-Ergebnisse.

Die Analyse der gewebespezifischen Expression der identifizierten HNF4 α -Zielgene belegte, dass eine hohe Anzahl der identifizierten Gene in der Niere exprimiert werden. Weiterhin wurden die identifizierten HNF4 α -Zielgene mit den Genen, die im Nierenzellkarzinom differentiell exprimiert werden, verglichen. Dabei zeigte es sich, dass 13 von den 65 HNF4 α -Zielgenen im Nierenzellkarzinom genau in der umgekehrten Richtung wie in den HEK293 Zellen reguliert sind. Man kann folglich spekulieren, dass diese 13 Gene (ACY1, WT1, SELENBP1, COBL, EFHD1, AGXT2L1, ALDH5A1, THEM2, ABCB1, FLJ14146, CSPG2, TRIM9 und HEY1) im NZK aufgrund der verminderten Expression von HNF4 α dereguliert sind.

Um die Gene zu identifizieren, die die HNF4 α -Effekte vermitteln, wurden Kandidatengene ausgewählt und diese durch Überexpressionsstudien untersucht. Die Überexpression der Gene WT1, MTM1, SEPP1 und DSC2 übte keinen Effekt auf die Proliferation und Morphologie der HEK293 Zellen aus. Somit sind diese Gene für die Vermittlung der HNF4 α -Effekte nicht essentiell. Als eine zweite alternative Methode zur Identifizierung der verantwortlichen HNF4 α -Zielgene wurde die RNA-Interferenz eingesetzt. Die angewandten Methoden erzielten jedoch keine effektive Reduktion der Genaktivitäten, so dass der Beitrag der Kandidatengene durch Repression nicht untersucht werden konnte. Folglich bleibt noch offen, welche Gene die proliferationshemmende Wirkung von HNF4 α in HEK293-Zellen vermitteln.

VI Literaturverzeichnis

- Ami, Y., Shimazui, T., Akaza, H., Uematsu, N., Yano, Y., Tsujimoto, G., and Uchida, K. (2005). Gene expression profiles correlate with the morphology and metastasis characteristics of renal cell carcinoma cells. *Oncol.Rep.* **13**, 75-80.
- Angrand, P. O., Woodroffe, C. P., Buchholz, F., and Stewart, A. F. (1998). Inducible expression based on regulated recombination: a single vector strategy for stable expression in cultured cells. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3263-3269.
- Argyrokastitis, A., Kamakari, S., Kapsetaki, M., Kritis, A., Talianidis, I., and Moschonas, N. K. (1997). Human hepatocyte nuclear factor-4 (hHNF-4) gene maps to 20q12-q13.1 between PLCG1 and D20S17. *Hum.Genet.* **99**, 233-236.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P. A., and Wollheim, C. B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* **130**, 167-178.
- Athman, R., Louvard, D., and Robine, S. (2002). The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. III. How is villin involved in the actin cytoskeleton dynamics in intestinal cells? *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **283**, G496-G502.
- Balabanov, S., Zimmermann, U., Protzel, C., Scharf, C., Klebingat, K. J., and Walther, R. (2001). Tumour-related enzyme alterations in the clear cell type of human renal cell carcinoma identified by two-dimensional gel electrophoresis. *Eur.J.Biochem.* **268**, 5977-5980.
- Barbacci, E., Reber, M., Ott, M. O., Breillat, C., Huetz, F., and Cereghini, S. (1999). Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification. *Development* **126**, 4795-4805.
- Bartoov-Shifman, R., Hertz, R., Wang, H., Wollheim, C. B., Bar-Tana, J., and Walker, M. D. (2002). Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J.Biol.Chem.* **277**, 25914-25919.
- Batsche, E., Desroches, J., Bilodeau, S., Gauthier, Y., and Drouin, J. (2005). Rb enhances 160/SRC coactivator-dependent activity of nuclear receptors and hormone responsiveness. *J.Biol.Chem.*
- Benoit, G., Malewicz, M., and Perlmann, T. (2004). Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends Cell Biol.* **14**, 369-376.
- Berasain, C., Herrero, J. I., Garcia-Trevijano, E. R., Avila, M. A., Esteban, J. I., Mato, J. M., and Prieto, J. (2003). Expression of Wilms' tumor suppressor in the liver with cirrhosis: Relation to hepatocyte nuclear factor 4 and hepatocellular function. *Hepatology* **38**, 148-157.
- Blondeau, F., Laporte, J., Bodin, S., Superti-Furga, G., Payrastre, B., and Mandel, J. L. (2000). Myotubularin, a phosphatase deficient in myotubular myopathy, acts on phosphatidylinositol 3-kinase and phosphatidylinositol 3-phosphate pathway. *Hum.Mol.Genet.* **9**, 2223-2229.
- Bluteau, O., Jeannot, E., Bioulac-Sage, P., Marques, J. M., Blanc, J. F., Bui, H., Beaudoin, J. C., Franco, D., Balabaud, C., Laurent-Puig, P., and Zucman-Rossi, J. (2002). Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat.Genet.* **32**, 312-315.
- Boer, J. M., Huber, W. K., Sultmann, H., Wilmer, F., von Heydebreck, A., Haas, S., Korn, B., Gunawan, B., Vente, A., Fuzesi, L., Vingron, M., and Poustka, A. (2001). Identification and classification of differentially expressed genes in renal cell carcinoma by expression profiling on a global human 31,500-element cDNA array. *Genome Res.* **11**, 1861-1870.
- Boj, S. F., Parrizas, M., Maestros, M. A., and Ferrer, J. (2001). A transcription factor regulatory circuit in differentiated pancreatic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 14481-14486.

- Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., Kmiecik, T. E., Vande Woude, G. F., and Aaronson, S. A.** (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* **251**, 802-804.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Burk, R. F. and Hill, K. E.** (2004). Selenoprotein P: An Extracellular Protein with Unique Physical Characteristics and a Role in Selenium Homeostasis. *Annu.Rev.Nutr.*
- Carew, J. A., Pollak, E. S., Lopaciuk, S., and Bauer, K. A.** (2000). A new mutation in the HNF4 binding region of the factor VII promoter in a patient with severe factor VII deficiency. *Blood* **96**, 4370-4372.
- Castanotto, D., Li, H., and Rossi, J. J.** (2002). Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA*. **8**, 1454-1460.
- Chabardes-Garonne, D., Mejean, A., Aude, J. C., Cheval, L., Di Stefano, A., Gaillard, M. C., Imbert-Teboul, M., Wittner, M., Balian, C., Anthouard, V., Robert, C., Segurens, B., Wincker, P., Weissenbach, J., Doucet, A., and Elalouf, J. M.** (2003). A panoramic view of gene expression in the human kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 13710-13715.
- Chang, P. W., Tsui, S. K., Liew, C., Lee, C. C., Waye, M. M., and Fung, K. P.** (1997). Isolation, characterization, and chromosomal mapping of a novel cDNA clone encoding human selenium binding protein. *J.Cell Biochem.* **64**, 217-224.
- Chen, G., Wang, H., Miller, C. T., Thomas, D. G., Gharib, T. G., Misek, D. E., Giordano, T. J., Orringer, M. B., Hanash, S. M., and Beer, D. G.** (2004). Reduced selenium-binding protein 1 expression is associated with poor outcome in lung adenocarcinomas. *J.Pathol.* **202**, 321-329.
- Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., Bachvarova, R. F., and Darnell, J. E., Jr.** (1994). Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev.* **8**, 2466-2477.
- Chiba, H., Gotoh, T., Kojima, T., Satohisa, S., Kikuchi, K., Osanai, M., and Sawada, N.** (2003). Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp.Cell Res.* **286**, 288-297.
- Chiba, H., Itoh, T., Satohisa, S., Sakai, N., Noguchi, H., Osanai, M., Kojima, T., and Sawada, N.** (2005). Activation of p21(CIP1/WAF1) gene expression and inhibition of cell proliferation by overexpression of hepatocyte nuclear factor-4alpha. *Exp.Cell Res.* **302**, 11-21.
- Choi, J. K., Choi, J. Y., Kim, D. G., Choi, D. W., Kim, B. Y., Lee, K. H., Yeom, Y. I., Yoo, H. S., Yoo, O. J., and Kim, S.** (2004). Integrative analysis of multiple gene expression profiles applied to liver cancer study. *FEBS Lett.* **565**, 93-100.
- Chou, W. C., Prokova, V., Shiraishi, K., Valcourt, U., Moustakas, A., Hadzopoulou-Cladaras, M., Zannis, V. I., and Kardassis, D.** (2003). Mechanism of a transcriptional cross talk between transforming growth factor-beta-regulated Smad3 and Smad4 proteins and orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor-4. *Mol.Biol.Cell* **14**, 1279-1294.
- Clotman, F., Libbrecht, L., Gresh, L., Yaniv, M., Roskams, T., Rousseau, G. G., and Lemaigre, F. P.** (2003). Hepatic artery malformations associated with a primary defect in intrahepatic bile duct development. *J.Hepatol.* **39**, 686-692.
- Cook, R. M., Franklin, W. A., Moore, M. D., Johnson, B. E., and Miller, Y. E.** (1998). Mutational inactivation of aminoacylase-I in a small cell lung cancer cell line. *Genes Chromosomes.Cancer* **21**, 320-325.

- Del Sal, G., Collavin, L., Ruaro, M. E., Edomi, P., Saccone, S., Valle, G. D., and Schneider, C.** (1994). Structure, function, and chromosome mapping of the growth-suppressing human homologue of the murine gas1 gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 1848-1852.
- Dhe-Paganon, S., Duda, K., Iwamoto, M., Chi, Y. I., and Shoelson, S. E.** (2002). Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J.Biol.Chem.* **277**, 37973-37976.
- Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., and Ryffel, G. U.** (1996). Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol.Cell Biol.* **16**, 925-931.
- Duncan, S. A., Nagy, A., and Chan, W.** (1997). Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* **124**, 279-287.
- Duncan, S. A., Navas, M. A., Dufort, D., Rossant, J., and Stoffel, M.** (1998). Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* **281**, 692-695.
- Eeckhoute, J., Moerman, E., Bouckennooghe, T., Lukowiak, B., Pattou, F., Formstecher, P., Kerr-Conte, J., Vandewalle, B., and Laine, B.** (2003). Hepatocyte nuclear factor 4 alpha isoforms originated from the P1 promoter are expressed in human pancreatic beta-cells and exhibit stronger transcriptional potentials than P2 promoter-driven isoforms. *Endocrinology* **144**, 1686-1694.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T.** (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188-200.
- Ellrott, K., Yang, C., Sladek, F. M., and Jiang, T.** (2002). Identifying transcription factor binding sites through Markov chain optimization. *Bioinformatics.* **18 Suppl 2**, S100-S109.
- Eng, C., Kiuru, M., Fernandez, M. J., and Aaltonen, L. A.** (2003). A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat.Rev.Cancer* **3**, 193-202.
- Ferrer, J.** (2002). A genetic switch in pancreatic beta-cells: implications for differentiation and haploinsufficiency. *Diabetes* **51**, 2355-2362.
- Frayling, T. M., Evans, J. C., Bulman, M. P., Pearson, E., Allen, L., Owen, K., Bingham, C., Hannemann, M., Shepherd, M., Ellard, S., and Hattersley, A. T.** (2001). beta-cell genes and diabetes: molecular and clinical characterization of mutations in transcription factors. *Diabetes* **50 Suppl 1**, S94-100.
- Furuta, H., Iwasaki, N., Oda, N., Hinokio, Y., Horikawa, Y., Yamagata, K., Yano, N., Sugahiro, J., Ogata, M., Ohgawara, H., Omori, Y., Iwamoto, Y., and Bell, G. I.** (1997). Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* **46**, 1652-1657.
- Gebhard, R. L., Clayman, R. V., Prigge, W. F., Figenshau, R., Staley, N. A., Reese, C., and Bear, A.** (1987). Abnormal cholesterol metabolism in renal clear cell carcinoma. *J.Lipid Res.* **28**, 1177-1184.
- Gieseg, M. A., Cody, T., Man, M. Z., Madore, S. J., Rubin, M. A., and Kaldjian, E. P.** (2002). Expression profiling of human renal carcinomas with functional taxonomic analysis. *BMC.Bioinformatics.* **3**, 26.
- Gnarra, J. R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M. H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F. M., and .** (1994). Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat.Genet.* **7**, 85-90.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R.** (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J.Gen.Virol.* **36**, 59-74.
- Green, V. J., Kokkotou, E., and Ladas, J. A.** (1998). Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4. *J.Biol.Chem.* **273**, 29950-29957.
- Grewal, J. S., Tsai, J. Y., and Khan, S. R.** (2005). Oxalate-inducible AMBP gene and its regulatory mechanism in renal tubular epithelial cells. *Biochem.J.* **387**, 609-616.

- Gupta, R. K. and Kaestner, K. H.** (2004). HNF-4alpha: from MODY to late-onset type 2 diabetes. *Trends Mol.Med.* **10**, 521-524.
- Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C., and Ladias, J. A.** (1997). Functional domains of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4. *J.Biol.Chem.* **272**, 539-550.
- Hayhurst, G. P., Lee, Y. H., Lambert, G., Ward, J. M., and Gonzalez, F. J.** (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1393-1403.
- Hazan, R. B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I., and Suyama, K.** (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1014**, 155-163.
- He, Q. Y., Cheung, Y. H., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Chu, K. M., and Chiu, J. F.** (2004). Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma. *Proteomics.* **4**, 3276-3287.
- Hertz, R., Magenheimer, J., Berman, I., and Bar-Tana, J.** (1998). Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* **392**, 512-516.
- Higgins, J. P., Wang, L., Kambham, N., Montgomery, K., Mason, V., Vogelmann, S. U., Lemley, K. V., Brown, P. O., Brooks, J. D., and van de, R. M.** (2004). Gene expression in the normal adult human kidney assessed by complementary DNA microarray. *Mol.Biol.Cell* **15**, 649-656.
- Hill, K. E., Lloyd, R. S., and Burk, R. F.** (1993). Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 537-541.
- Holewa, B., Strandmann, E. P., Zapp, D., Lorenz, P., and Ryffel, G. U.** (1996). Transcriptional hierarchy in *Xenopus* embryogenesis: HNF4 a maternal factor involved in the developmental activation of the gene encoding the tissue specific transcription factor HNF1 alpha (LFB1). *Mech.Dev.* **54**, 45-57.
- Holewa, B., Zapp, D., Drewes, T., Senkel, S., and Ryffel, G. U.** (1997). HNF4beta, a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol.Cell Biol.* **17**, 687-694.
- Huang, L. E., Ho, V., Arany, Z., Krainc, D., Galson, D., Tendler, D., Livingston, D. M., and Bunn, H. F.** (1997). Erythropoietin gene regulation depends on heme-dependent oxygen sensing and assembly of interacting transcription factors. *Kidney Int.* **51**, 548-552.
- Iakova, P., Awad, S. S., and Timchenko, N. A.** (2003). Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell* **113**, 495-506.
- Inoue, Y., Miyazaki, M., Tsuji, T., Sakaguchi, M., Fukaya, K., Huh, N. H., and Namba, M.** (2001). Reactivation of liver-specific gene expression in an immortalized human hepatocyte cell line by introduction of the human HNF4alpha2 gene. *Int.J.Mol.Med.* **8**, 481-487.
- International Human Genome Sequencing Consortium** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- International Human Genome Sequencing Consortium** (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, 931-945.
- Ishiyama, T., Kano, J., Minami, Y., Iijima, T., Morishita, Y., and Noguchi, M.** (2003). Expression of HNFs and C/EBP alpha is correlated with immunocytochemical differentiation of cell lines derived from human hepatocellular carcinomas, hepatoblastomas and immortalized hepatocytes. *Cancer Sci.* **94**, 757-763.
- Ji, L., Malecki, M., Warram, J. H., Yang, Y., Rich, S. S., and Krolewski, A. S.** (1997). New susceptibility locus for NIDDM is localized to human chromosome 20q. *Diabetes* **46**, 876-881.

- Jiang, G. and Sladek, F. M.** (1997). The DNA binding domain of hepatocyte nuclear factor 4 mediates cooperative, specific binding to DNA and heterodimerization with the retinoid X receptor alpha. *J.Biol.Chem.* **272**, 1218-1225.
- Jiang, S., Tanaka, T., Iwanari, H., Hotta, H., Yamashita, H., Kumakura, J., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Aburatani, H., Hamakubo, T., Kodama, T., and Naito, M.** (2003). Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha (HNF4alpha) isoforms in human and rats. *Nucl.Recept.* **1**, 5.
- Khoo, S. K., Kahnoski, K., Sugimura, J., Petillo, D., Chen, J., Shockley, K., Ludlow, J., Knapp, R., Giraud, S., Richard, S., Nordenskjold, M., and Teh, B. T.** (2003). Inactivation of BHD in sporadic renal tumors. *Cancer Res.* **63**, 4583-4587.
- Knudson, A. G., Jr.** (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **68**, 820-823.
- Knudson, A. G.** (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 10914-10921.
- Koch, P. J. and Franke, W. W.** (1994). Desmosomal cadherins: another growing multigene family of adhesion molecules. *Curr.Opin.Cell Biol.* **6**, 682-687.
- Kovacs, G., Akhtar, M., Beckwith, B. J., Bugert, P., Cooper, C. S., Delahunt, B., Eble, J. N., Fleming, S., Ljungberg, B., Medeiros, L. J., Moch, H., Reuter, V. E., Ritz, E., Roos, G., Schmidt, D., Srigley, J. R., Storkel, S., van den, B. E., and Zbar, B.** (1997). The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J.Pathol.* **183**, 131-133.
- Kowalczyk, A. P., Bornslaeger, E. A., Norvell, S. M., Palka, H. L., and Green, K. J.** (1999). Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int.Rev.Cytol.* **185**, 237-302.
- Kowalczyk, A. P., Palka, H. L., Luu, H. H., Nilles, L. A., Anderson, J. E., Wheelock, M. J., and Green, K. J.** (1994). Posttranslational regulation of plakoglobin expression. Influence of the desmosomal cadherins on plakoglobin metabolic stability. *J.Biol.Chem.* **269**, 31214-31223.
- Ktistaki, E. and Talianidis, I.** (1997). Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors act as auxiliary cofactors for hepatocyte nuclear factor 4 and enhance hepatic gene expression. *Mol.Cell Biol.* **17**, 2790-2797.
- Kuo, C. J., Conley, P. B., Chen, L., Sladek, F. M., Darnell, J. E., Jr., and Crabtree, G. R.** (1992). A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* **355**, 457-461.
- Laine, B., Eeckhoutte, J., Suaud, L., Briche, I., Furuta, H., Bell, G. I., and Formstecher, P.** (2000). Functional properties of the R154X HNF-4alpha protein generated by a mutation associated with maturity-onset diabetes of the young, type 1. *FEBS Lett.* **479**, 41-45.
- Laporte, J., Blondeau, F., Buj-Bello, A., and Mandel, J. L.** (2001). The myotubularin family: from genetic disease to phosphoinositide metabolism. *Trends Genet.* **17**, 221-228.
- Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., Yao, M., Duh, F. M., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Kuzmin, I., Modi, W., Geil, L., and .** (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* **260**, 1317-1320.
- Lausen, J., Thomas, H., Lemm, I., Bulman, M., Borgschulze, M., Lingott, A., Hattersley, A. T., and Ryffel, G. U.** (2000). Naturally occurring mutations in the human HNF4alpha gene impair the function of the transcription factor to a varying degree. *Nucleic Acids Res.* **28**, 430-437.
- Lazarevich, N. L., Cheremnova, O. A., Varga, E. V., Ovchinnikov, D. A., Kudrjavytseva, E. I., Morozova, O. V., Fleishman, D. I., Engelhardt, N. V., and Duncan, S. A.** (2004). Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology* **39**, 1038-1047.

- Lee, S. B. and Haber, D. A. (2001). Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp.Cell Res.* **264**, 74-99.
- Lee, Y. K., Dell, H., Dowhan, D. H., Hadzopoulou-Cladaras, M., and Moore, D. D. (2000). The orphan nuclear receptor SHP inhibits hepatocyte nuclear factor 4 and retinoid X receptor transactivation: two mechanisms for repression. *Mol.Cell Biol.* **20**, 187-195.
- Lehto, M., Bitzen, P. O., Isomaa, B., Wipemo, C., Wessman, Y., Forsblom, C., Tuomi, T., Taskinen, M. R., and Groop, L. (1999). Mutation in the HNF-4alpha gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism. *Diabetes* **48**, 423-425.
- Lenburg, M. E., Liou, L. S., Gerry, N. P., Frampton, G. M., Cohen, H. T., and Christman, M. F. (2003). Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC.Cancer* **3**, 31.
- Li, J., Ning, G., and Duncan, S. A. (2000). Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev.* **14**, 464-474.
- Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., and Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769-773.
- Lindblad, P., Chow, W. H., Chan, J., Bergstrom, A., Wolk, A., Gridley, G., McLaughlin, J. K., Nyren, O., and Adami, H. O. (1999). The role of diabetes mellitus in the aetiology of renal cell cancer. *Diabetologia* **42**, 107-112.
- Linehan, W. M. and Zbar, B. (2004). Focus on kidney cancer. *Cancer Cell* **6**, 223-228.
- Liou, L. S., Shi, T., Duan, Z. H., Sadhukhan, P., Der, S. D., Novick, A. A., Hissong, J., Skacel, M., Almasan, A., and DiDonato, J. A. (2004). Microarray gene expression profiling and analysis in renal cell carcinoma. *BMC.Urol.* **4**, 9.
- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E. L. (1996). Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat.Biotechnol.* **14**, 1675-1680.
- Love-Gregory, L. D., Wasson, J., Ma, J., Jin, C. H., Glaser, B., Suarez, B. K., and Permutt, M. A. (2004). A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an ashkenazi jewish population. *Diabetes* **53**, 1134-1140.
- Maeda, Y., Seidel, S. D., Wei, G., Liu, X., and Sladek, F. M. (2002). Repression of hepatocyte nuclear factor 4alpha tumor suppressor p53: involvement of the ligand-binding domain and histone deacetylase activity. *Mol.Endocrinol.* **16**, 402-410.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and . (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835-839.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., and Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J.Exp.Med.* **182**, 1545-1556.
- Medina, D. and Morrison, D. G. (1988). Current ideas on selenium as a chemopreventive agent. *Pathol.Immunopathol.Res.* **7**, 187-199.
- Miquerol, L., Lopez, S., Cartier, N., Tulliez, M., Raymondjean, M., and Kahn, A. (1994). Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J.Biol.Chem.* **269**, 8944-8951.

- Morrissey, E. E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M. M., Jiang, F., Ip, H. S., and Parmacek, M. S. (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* **12**, 3579-3590.
- Mostert, V. (2000). Selenoprotein P: properties, functions, and regulation. *Arch.Biochem.Biophys.* **376**, 433-438.
- Motzer, R. J. and Russo, P. (2000). Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J.Urol.* **163**, 408-417.
- Naiki, T., Nagaki, M., Shidoji, Y., Kojima, H., Imose, M., Kato, T., Ohishi, N., Yagi, K., and Moriwaki, H. (2002). Analysis of gene expression profile induced by hepatocyte nuclear factor 4alpha in hepatoma cells using an oligonucleotide microarray. *J.Biol.Chem.* **277**, 14011-14019.
- Nakhei, H., Lingott, A., Lemm, I., and Ryffel, G. U. (1998). An alternative splice variant of the tissue specific transcription factor HNF4alpha predominates in undifferentiated murine cell types. *Nucleic Acids Res.* **26**, 497-504.
- Nickerson, M. L., Warren, M. B., Toro, J. R., Matrosova, V., Glenn, G., Turner, M. L., Duray, P., Merino, M., Choyke, P., Pavlovich, C. P., Sharma, N., Walther, M., Munroe, D., Hill, R., Maher, E., Greenberg, C., Lerman, M. I., Linehan, W. M., Zbar, B., and Schmidt, L. S. (2002). Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dube syndrome. *Cancer Cell* **2**, 157-164.
- Nolan, T. and Cogoni, C. (2004). The long hand of the small RNAs reaches into several levels of gene regulation. *Biochem.Cell Biol.* **82**, 472-481.
- Nuclear Receptors Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161-163.
- Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., Fraenkel, E., Bell, G. I., and Young, R. A. (2004). Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**, 1378-1381.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., Sachidanandam, R., and Hannon, G. J. (2004). Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *Methods Mol.Biol.* **265**, 85-100.
- Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., Kaestner, K. H., Rossi, J. M., Zaret, K. S., and Duncan, S. A. (2003). Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat.Genet.* **34**, 292-296.
- Patrick, L. (2004). Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. *Altern.Med.Rev.* **9**, 239-258.
- Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., and Comoglio, P. M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* **3**, 347-361.
- Permutt, M. A., Chiu, K., Ferrer, J., Glaser, B., Inoue, H., Nestorowicz, A., Stanley, C. A., and Tanizawa, Y. (1998). Genetics of type II diabetes. *Recent Prog.Horm.Res.* **53**, 201-216.
- Petrescu, A. D., Hertz, R., Bar-Tana, J., Schroeder, F., and Kier, A. B. (2002). Ligand specificity and conformational dependence of the hepatic nuclear factor-4alpha (HNF-4alpha). *J.Biol.Chem.* **277**, 23988-23999.
- Rajas, F., Gautier, A., Bady, I., Montano, S., and Mithieux, G. (2002). Polyunsaturated fatty acyl coenzyme A suppress the glucose-6-phosphatase promoter activity by modulating the DNA binding of hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *J.Biol.Chem.* **277**, 15736-15744.
- Rauscher, F. J., III (1993). The WT1 Wilms tumor gene product: a developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J.* **7**, 896-903.

- Rebouissou, S., Vasiliu, V., Thomas, C., Bellanne-Chantelot, C., Bui, H., Chretien, Y., Timsit, J., Rosty, C., Laurent-Puig, P., Chauveau, D., and Zucman-Rossi, J.** (2005). Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas. *Hum.Mol.Genet.* **14**, 603-614.
- Reijnen, M. J., Peerlinck, K., Maasdam, D., Bertina, R. M., and Reitsma, P. H.** (1993). Hemophilia B Leyden: substitution of thymine for guanine at position -21 results in a disruption of a hepatocyte nuclear factor 4 binding site in the factor IX promoter. *Blood* **82**, 151-158.
- Reijnen, M. J., Sladek, F. M., Bertina, R. M., and Reitsma, P. H.** (1992). Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 6300-6303.
- Roth, U., Curth, K., Unterman, T. G., and Kietzmann, T.** (2004). The transcription factors HIF-1 and HNF-4 and the coactivator p300 are involved in insulin-regulated glucokinase gene expression via the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J.Biol.Chem.* **279**, 2623-2631.
- Runswick, S. K., O'Hare, M. J., Jones, L., Streuli, C. H., and Garrod, D. R.** (2001). Desmosomal adhesion regulates epithelial morphogenesis and cell positioning. *Nat.Cell Biol.* **3**, 823-830.
- Ruse, M. D., Jr., Privalsky, M. L., and Sladek, F. M.** (2002). Competitive cofactor recruitment by orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1: modulation by the F domain. *Mol.Cell Biol.* **22**, 1626-1638.
- Ryffel, G. U.** (2001). Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J.Mol.Endocrinol.* **27**, 11-29.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). 'Molecular cloning - a laboratory manual.' (Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York:
- Sanchez-Elsner, T., Ramirez, J. R., Sanz-Rodriguez, F., Varela, E., Bernabeu, C., and Botella, L. M.** (2004). A cross-talk between hypoxia and TGF-beta orchestrates erythropoietin gene regulation through SP1 and Smads. *J.Mol.Biol.* **336**, 9-24.
- Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., Allikmets, R., Chidambaram, A., Bergerheim, U. R., Feltis, J. T., Casadevall, C., Zamarron, A., Bernues, M., Richard, S., Lips, C. J., Walther, M. M., Tsui, L. C., Geil, L., Orcutt, M. L., Stackhouse, T., Zbar, B., and .** (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat.Genet.* **16**, 68-73.
- Schmidt, L., Junker, K., Nakaigawa, N., Kinjerski, T., Weirich, G., Miller, M., Lubensky, I., Neumann, H. P., Brauch, H., Decker, J., Vocke, C., Brown, J. A., Jenkins, R., Richard, S., Bergerheim, U., Gerrard, B., Dean, M., Linehan, W. M., and Zbar, B.** (1999). Novel mutations of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Oncogene* **18**, 2343-2350.
- Sel, S., Ebert, T., Ryffel, G. U., and Drewes, T.** (1996). Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4 alpha and HNF1 alpha. *Cancer Lett.* **101**, 205-210.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F. L.** (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* **16**, 869-871.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M.** (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* **13**, 1501-1512.
- Shih, D. Q., Dansky, H. M., Fleisher, M., Assmann, G., Fajans, S. S., and Stoffel, M.** (2000). Genotype/phenotype relationships in HNF-4alpha/MODY1: haploinsufficiency is associated with reduced apolipoprotein (AII), apolipoprotein (CIII), lipoprotein(a), and triglyceride levels. *Diabetes* **49**, 832-837.

- Shih, D. Q., Screenan, S., Munoz, K. N., Philipson, L., Pontoglio, M., Yaniv, M., Polonsky, K. S., and Stoffel, M.** (2001). Loss of HNF-1alpha function in mice leads to abnormal expression of genes involved in pancreatic islet development and metabolism. *Diabetes* **50**, 2472-2480.
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H. L., and Hayoz, D.** (2004). Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol.Life Sci.* **61**, 2614-2623.
- Silander, K., Mohlke, K. L., Scott, L. J., Peck, E. C., Hollstein, P., Skol, A. D., Jackson, A. U., Deloukas, P., Hunt, S., Stavrides, G., Chines, P. S., Erdos, M. R., Narisu, N., Conneely, K. N., Li, C., Fingerlin, T. E., Dhanjal, S. K., Valle, T. T., Bergman, R. N., Tuomilehto, J., Watanabe, R. M., Boehnke, M., and Collins, F. S.** (2004). Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes* **53**, 1141-1149.
- Sladek, F.** (2002). Desperately seeking...something. *Mol.Cell* **10**, 219-221.
- Sladek, F. M., Ruse, M. D., Jr., Nepomuceno, L., Huang, S. M., and Stallcup, M. R.** (1999). Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1. *Mol.Cell Biol.* **19**, 6509-6522.
- Sladek, F. M. and Seidel, S. D.** (2001). Hepatocyte nuclear factor 4alpha. In 'Nuclear Receptors and Genetic Disease'. (Eds. T.B.Burris and E.R.B.McCabe.) pp. 309-61. (San Diego: Academic Press:
- Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E., and Darnell, J. E., Jr.** (1990). Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev.* **4**, 2353-2365.
- Späth, G. F. and Weiss, M. C.** (1997). Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol.Cell Biol.* **17**, 1913-1922.
- Späth, G. F. and Weiss, M. C.** (1998). Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J.Cell Biol.* **140**, 935-946.
- Stoffel, M. and Duncan, S. A.** (1997). The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 13209-13214.
- Struckmann, K., Schraml, P., Simon, R., Elmenhorst, K., Mirlacher, M., Kononen, J., and Moch, H.** (2004). Impaired expression of the cell cycle regulator BTG2 is common in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **64**, 1632-1638.
- Stumpf, H., Senkel, S., Rabes, H. M., and Ryffel, G. U.** (1995). The DNA binding activity of the liver transcription factors LFB1 (HNF1) and HNF4 varies coordinately in rat hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **16**, 143-145.
- Suaud, L., Formstecher, P., and Laine, B.** (1999). The activity of the activation function 2 of the human hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4alpha) is differently modulated by F domains from various origins. *Biochem.J.* **340** (Pt 1), 161-169.
- Suaud, L., Joseph, B., Formstecher, P., and Laine, B.** (1997). mRNA expression of HNF-4 isoforms and of HNF-1alpha/HNF-1beta variants and differentiation of human cell lines that mimic highly specialized phenotypes of intestinal epithelium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **235**, 820-825.
- Takahashi, M., Rhodes, D. R., Furge, K. A., Kanayama, H., Kagawa, S., Haab, B. B., and Teh, B. T.** (2001). Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 9754-9759.
- Takahashi, M., Yang, X. J., Sugimura, J., Backdahl, J., Tretiakova, M., Qian, C. N., Gray, S. G., Knapp, R., Anema, J., Kahnoski, R., Nicol, D., Vogelzang, N. J., Furge, K. A., Kanayama, H., Kagawa, S., and Teh, B. T.** (2003). Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. *Oncogene* **22**, 6810-6818.

- Tanimizu, N. and Miyajima, A.** (2004). Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *J.Cell Sci.* **117**, 3165-3174.
- Taraviras, S., Mantamadiotis, T., Dong-Si, T., Mincheva, A., Lichter, P., Drewes, T., Ryffel, G. U., Monaghan, A. P., and Schutz, G.** (2000). Primary structure, chromosomal mapping, expression and transcriptional activity of murine hepatocyte nuclear factor 4gamma. *Biochim.Biophys.Acta* **1490**, 21-32.
- Taraviras, S., Monaghan, A. P., Schutz, G., and Kelsey, G.** (1994). Characterization of the mouse HNF-4 gene and its expression during mouse embryogenesis. *Mech.Dev.* **48**, 67-79.
- Taylor, D. G., Haubenwallner, S., and Leff, T.** (1996). Characterization of a dominant negative mutant form of the HNF-4 orphan receptor. *Nucleic.Acids.Res.* **24**, 2930-2935.
- Taylor, G. S., Maehama, T., and Dixon, J. E.** (2000). Inaugural article: myotubularin, a protein tyrosine phosphatase mutated in myotubular myopathy, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3-phosphate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 8910-8915.
- Thomas, H., Jaschowitz, K., Bulman, M., Frayling, T. M., Mitchell, S. M., Roosen, S., Lingott-Frieg, A., Tack, C. J., Ellard, S., Ryffel, G. U., and Hattersley, A. T.** (2001). A distant upstream promoter of the HNF-4alpha gene connects the transcription factors involved in maturity-onset diabetes of the young. *Hum.Mol.Genet.* **10**, 2089-2097.
- Thomas, H., Senkel, S., Erdmann, S., Arndt, T., Turan, G., Klein-Hitpass, L., and Ryffel, G. U.** (2004). Pattern of genes influenced by conditional expression of the transcription factors HNF6, HNF4alpha and HNF1beta in a pancreatic beta-cell line. *Nucleic Acids Res.* **32**, e150.
- Tian, J. M. and Schibler, U.** (1991). Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes Dev.* **5**, 2225-2234.
- Tomlinson, I. P., Alam, N. A., Rowan, A. J., Barclay, E., Jaeger, E. E., Kelsell, D., Leigh, I., Gorman, P., Lamlum, H., Rahman, S., Roylance, R. R., Olpin, S., Bevan, S., Barker, K., Hearle, N., Houlston, R. S., Kiuru, M., Lehtonen, R., Karhu, A., Vilkkki, S., Laiho, P., Eklund, C., Vierimaa, O., Aittomaki, K., Hietala, M., Sistonen, P., Paetau, A., Salovaara, R., Herva, R., Launonen, V., and Aaltonen, L. A.** (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat.Genet.* **30**, 406-410.
- Torban, E. and Goodyer, P. R.** (1998). Effects of PAX2 expression in a human fetal kidney (HEK293) cell line. *Biochim.Biophys.Acta* **1401**, 53-62.
- Toro, J. R., Nickerson, M. L., Wei, M. H., Warren, M. B., Glenn, G. M., Turner, M. L., Stewart, L., Duray, P., Tourre, O., Sharma, N., Choyke, P., Stratton, P., Merino, M., Walther, M. M., Linehan, W. M., Schmidt, L. S., and Zbar, B.** (2003). Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *Am.J.Hum.Genet.* **73**, 95-106.
- Torres-Padilla, M. E., Fougere-Deschatrette, C., and Weiss, M. C.** (2001). Expression of HNF4alpha isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promoter usage and constitutive 3' end splicing. *Mech.Dev.* **109**, 183-193.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H. M., and Schutz, G.** (1998). Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **8**, 532-538.
- Wagner, K. D., Wagner, N., and Schedl, A.** (2003). The complex life of WT1. *J.Cell Sci.* **116**, 1653-1658.
- Wang, H., Goode, T., Iakova, P., Albrecht, J. H., and Timchenko, N. A.** (2002). C/EBPalpha triggers proteasome-dependent degradation of cdk4 during growth arrest. *EMBO J.* **21**, 930-941.
- Wang, H., Iakova, P., Wilde, M., Welm, A., Goode, T., Roesler, W. J., and Timchenko, N. A.** (2001). C/EBPalpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol.Cell* **8**, 817-828.

- Wang, H., Maechler, P., Antinozzi, P. A., Hagenfeldt, K. A., and Wollheim, C. B. (2000). Hepatocyte nuclear factor 4 α regulates the expression of pancreatic beta -cell genes implicated in glucose metabolism and nutrient-induced insulin secretion. *J.Biol.Chem.* **275**, 35953-35959.
- Weedon, M. N., Owen, K. R., Shields, B., Hitman, G., Walker, M., McCarthy, M. I., Love-Gregory, L. D., Permutt, M. A., Hattersley, A. T., and Frayling, T. M. (2004). Common Variants of the Hepatocyte Nuclear Factor-4{ α } P2 Promoter Are Associated With Type 2 Diabetes in the U.K. Population. *Diabetes* **53**, 3002-3006.
- Werdien, D., Peiler, G., and Ryffel, G. U. (2001). FLP and Cre recombinase function in Xenopus embryos. *Nucleic Acids Res.* **29**, E53.
- Willson, T. M. and Moore, J. T. (2002). Genomics versus orphan nuclear receptors--a half-time report. *Mol.Endocrinol.* **16**, 1135-1144.
- Wisely, G. B., Miller, A. B., Davis, R. G., Thornquest, A. D., Jr., Johnson, R., Spitzer, T., Sefler, A., Shearer, B., Moore, J. T., Miller, A. B., Willson, T. M., and Williams, S. P. (2002). Hepatocyte nuclear factor 4 is a transcription factor that constitutively binds fatty acids. *Structure.(Camb.)* **10**, 1225-1234.
- Xu, X. R., Huang, J., Xu, Z. G., Qian, B. Z., Zhu, Z. D., Yan, Q., Cai, T., Zhang, X., Xiao, H. S., Qu, J., Liu, F., Huang, Q. H., Cheng, Z. H., Li, N. G., Du, J. J., Hu, W., Shen, K. T., Lu, G., Fu, G., Zhong, M., Xu, S. H., Gu, W. Y., Huang, W., Zhao, X. T., Hu, G. X., Gu, J. R., Chen, Z., and Han, Z. G. (2001). Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 15089-15094.
- Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Cox, N. J., Fajans, S. S., Signorini, S., Stoffel, M., and Bell, G. I. (1996). Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4 α gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* **384**, 458-460.
- Yao, M., Tabuchi, H., Nagashima, Y., Baba, M., Nakaigawa, N., Ishiguro, H., Hamada, K., Inayama, Y., Kishida, T., Hattori, K., Yamada-Okabe, H., and Kubota, Y. (2005). Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma. *J.Pathol.* **205**, 377-387.
- Young, A. N., Amin, M. B., Moreno, C. S., Lim, S. D., Cohen, C., Petros, J. A., Marshall, F. F., and Neish, A. S. (2001). Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *Am.J.Pathol.* **158**, 1639-1651.
- Zhang, J. M., Zhao, X., Wei, Q., and Paterson, B. M. (1999). Direct inhibition of G(1) cdk kinase activity by MyoD promotes myoblast cell cycle withdrawal and terminal differentiation. *EMBO J.* **18**, 6983-6993.

VII Anhang

1 Mikroarray

Tab. VII.1: Gentranskripte, die nach 6 Std. Induktion in der Zelllinie HNF4 α wt #1 reguliert waren.

Probe set HG-U95A	Gensymbol	Genname	Fold Change	Funktion
36722_s_at	HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	38	
36721_s_at	HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	34,6	
33713_at	TIMM17B	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog B (yeast)	6,5	Transport
40360_at	SLC10A3	solute carrier family 10, member 3	4,2	Transport
35669_at	COBL	cordon-bleu homolog (mouse)	3,8	---
36377_at	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	3,5	Signaltransduktion
770_at	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	3,3	Transport
37536_at	CD83	CD83 antigen	3,2	---
36864_at	PEX3	peroxisomal biogenesis factor 3	2,9	---
35831_at	ATP9A	ATPase, Class II, type 9A	2,5	Transport
1288_s_at	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	2,2	Translation
32661_s_at	MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint 1	2,1	---
36578_at	BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	2	Apoptose

Für die Analyse wurde der HG-U95A Genechip (Affymetrix) eingesetzt. Die verwendeten Filterbedingungen sind in Tab. III.1 aufgelistet.

Tab. VII.2: Anzahl der regulierten Proben in der Zelllinie HNF4 α wt #1 zu den angegebenen Zeiten.

Zelllinie	Anzahl der regulierten Proben in dem Genchip HG-U95A				
	15 Std.	24 Std.(1)	24 Std. (2)	48 Std.	15, 24(1), 24(2) und 48 Std.
HNF4 α #1	140 (90 I, 50 D)	157 (90 I, 67 D)	150 (74 I, 76 D)	133 (83 I, 50 D)	34 (26 I, 8 D)

Für die Analyse wurde der HG-U95A Genechip (Affymetrix) eingesetzt. Die verwendeten Filterbedingungen sind in Tab. III.1 aufgelistet. In Klammern ist die Anzahl der induzierten (I) und reprimierten Proben (D) angegeben. Für die Induktionszeit 24 Std. wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Tab. VII. 3: Gentranskripte, die nach 15, 24 und 48 Std. Induktion in der Zelllinie HNF4 α wt #1 reguliert waren.

Probe set HG-95A	Gensymbol	Genname					Funktion
			15h	24h (1)	24h (2)	48h	
36721_s_at	HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	20,7	16,7	11,2	18,6	
36722_s_at	HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	8,6	6,8	4,9	8,7	
38335_at	OGG1	8-oxoguanine DNA glycosylase	7	7,4	4,8	8,3	
33978_at	ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	5,8	4,7	5,8	5,7	Metabolismus
36377_at	IL18R1	interleukin 18 receptor 1	5,5	5,4	6,2	4,3	Signaltransduktion

34176_at	LOC57228	hypothetical protein from clone 643	5,2	4,5	6,1	5,4	---	
38621_at	DDAH2	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	4,3	4,5	6,2	5,5		Metabolismus
37930_at	ATP7B	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide (Wilson disease)	4,9	4,9	5,8	3,9		Transport
39613_at	MAN1A1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	4,4	4,6	5,2	2,8		
39302_at	DSC2	desmocollin 2	4	3,8	4,9	3,1		Zelladhäsion
37420_i_at	HLA-F	major histocompatibility complex, class I, F	2,6	4	3,6	5,3		
1575_at	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	3,3	3,7	4,2	3,2		
33369_at	---	---	3,8	4	2,9	3,6	---	
36298_at	PRPH	peripherin	3	4,2	3,9	3,1		
41057_at	THEM2	thioesterase superfamily member 2	3,1	3,2	3,3	3,3		
39099_at	SEC23A	Sec23 homolog A (S. cerevisiae)	3,2	3,2	3,1	2,5		Transport
41058_g_at	THEM2	thioesterase superfamily member 2	2,5	2,9	3,3	3,1		
37405_at	SELENBP1	selenium binding protein 1	2,1	2,7	3,3	3,2		
32207_at	MPP1	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	2,4	2,9	3,4	2,6		Signaltransduktion
820_at	MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	2,6	2,6	3,2	2,8		
41790_at	ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	2,6	2,6	3,1	2,8		Metabolismus
36864_at	PEX3	peroxisomal biogenesis factor 3	2,6	2,9	2,7	2,5		
37740_r_at	SLC25A5	solute carrier family 25	2,3	3,3	2,1	2,1		
32598_at	NELL2	NEL-like 2 (chicken)	2,2	2,6	2,6	2,3		Zelladhäsion
1924_at	CCNH	cyclin H	2,2	2,1	2,3	2,3		
38441_s_at	MCP	membrane cofactor protein	2,1	2,1	2,1	2		
1842_at	---	---	-6,5	-9,3	-2,5	-5,6	---	
37032_at	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	-6,6	-6,2	-5,3	-4,2		
38650_at	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	-5,3	-5,3	-4,4	-3,5		Zellproliferation
41073_at	LGR5	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	-4,3	-4,5	-3,9	-4,5		
32186_at	SLC7A5	solute carrier family 7	-4	-3,5	-2,8	-4,1		Metabolismus
32749_s_at	FLNA	filamin A, alpha	-2,3	-5,2	-2,6	-2,3		Zytoskelettprotein
35778_at	KIF5C	kinesin family member 5C	-2,2	-3,4	-2,4	-3,1		Zytoskelettprotein
40995_at	NEFL	neurofilament, light polypeptide 68kDa	-2,6	-2,3	-2,8	-2		

Für die Analyse wurde der HG-U95A Genechip (Affymetrix) eingesetzt. Die verwendeten Filterbedingungen sind in Tab. III.1 aufgelistet. Für die Induktionszeit 24 Std. wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2 Validierung mit dem TaqMan Low Density Array

Tab. VII.4: Gene auf dem TaqMan Low Density Array.

Mikroarray HG-U133A, fold change $\geq 2,0$		Mikroarray HG-U133A, fold change $< 2,0$	Mikroarray HG-U133A, present-call Filter nicht erfüllt	Mikroarray HG-U95A, fold change $\geq 2,0$	aus einer anderen Auswertungsmethode
ABCB1	IL18R1	ALCAM	C14orf78	CEBPB *	DYRK1B *
ABCB4	KIFAP3	CRAT	IF	HLA-F *	MAPKAPK3 *
ACADVL	LASP1	DBI		NELL2	
ACOX1	LOC57228	DUSP1 *		NNMT *	
ACY1	MAN1A1	GAB1		OGG1	
AGXT2L1	MGC33190	IRS2		PEX3	
AKAP1	MGST2	ITGA6		PPP1R1A	
ALDH5A1	MPP1	ITGB4BP		SC4MOL *	
ATP7B	MTM1	KIAA0152		SEC23A	
BIRC2	NEFL	MAP3K11		SLC7A5*	
CFLAR	NID	MCP		SPP1	
CIDEB *	NPR2L *	NK4		TM4SF5	
CLN6 *	OATPX	UGDH			
COBL	OSBPL3	CCNH			
COL21A1	PKP2				
CSPG2 *	PRPH *				
DDAH2	RBSK				
DSC2	SDC4				
ERBB3	SELENBP1				
FLJ13236	SEPP1				
FLJ13612	TACC2				
FLJ14146	TRAF4				
GAS1	TRIM9				
GPR49	VIL1				
HEY1	WT1				
HNF4A					

Die Gene sind alphabetisch geordnet. Mit einem Asteriskus (*) sind die nicht validierten Gene gekennzeichnet.

Tab. VII.5: Validierung der Mikroarray-Ergebnisse mittels TaqMan Low Density Array.

Gen	fold change Real-time PCR					
	HNF4 α wt #1		HNF4 α wt #4		HNF4 α C106R #	
	(1. RNA)	(2. RNA)	(1. RNA)	(2. RNA)	(1. RNA)	(2. RNA)
ABCB1_1	5,70	4,93	4,12	5,01	0,92	0,94
ABCB1_2	5,71	4,85	4,24	4,28	0,90	0,93
ABCB4_1	10,75	8,50	7,63	6,36	0,84	0,78
ABCB4_2	11,25	7,86	6,61	6,20	0,79	0,79
ACADVL	4,05	3,70	2,67	3,17	0,71	1,06
ACOX1_1	4,17	3,39	2,90	3,03	0,94	0,95
ACOX1_2	4,42	3,62	2,89	3,16	0,74	1,02
ACY1	6,29	4,95	4,34	3,50	0,77	0,85
AGXT2L1	7,42	5,12	4,77	5,32	1,03	1,13
AKAP1	3,37	3,16	2,61	2,43	0,77	1,02
ALCAM	2,11	2,09	1,84	1,79	0,78	0,87
ALDH5A1_1	4,06	2,20	2,53	2,86	0,72	0,80
ALDH5A1_2	4,24	4,09	2,77	3,40	0,76	0,94

ATP7B	3,89	3,61	2,76	2,65	0,76	0,94
BIRC2	3,06	2,67	2,06	2,32	0,78	0,82
CCNH	3,11	2,76	2,26	2,63	0,79	0,98
CEBPB	1,20	0,97	0,54	0,62	0,99	0,78
CFLAR	3,74	3,45	2,95	3,11	0,94	1,04
CIDEB	0,10	< 0,05	< 0,05	0,06	< 0,05	0,06
CLN6	1,23	0,95	0,74	0,69	0,74	0,66
COBL_1	5,28	4,29	3,43	3,97	0,68	1,01
COBL_2	3,63	3,80	3,55	3,16	0,68	0,83
COL21A1	5,10	4,55	3,44	3,83	0,98	1,00
CRAT_1	9,37	12,14	4,44	10,23	0,68	1,60
CRAT_2	11,58	10,06	8,54	7,93	0,89	1,05
CSPG2	0,74	0,38	0,53	0,62	0,97	1,01
DBI	3,57	2,51	2,14	2,03	1,05	0,94
DDAH2	21,59	20,28	12,61	12,58	1,37	1,12
DSC2	4,49	3,92	2,64	2,69	0,80	0,87
DUSP1	1,06	1,12	0,74	1,05	0,79	1,02
DYRK1B	1,96	1,85	1,00	1,59	0,81	0,83
EPHA2	3,30	2,27	2,63	2,25	0,80	1,06
ERBB3	6,71	6,03	5,58	5,80	0,81	0,91
FLJ13236	16,51	14,46	12,73	11,02	0,87	1,01
FLJ13612	8,25	6,77	5,58	5,29	0,73	0,93
FLJ14146	9,11	7,77	5,79	5,25	0,94	0,91
GAB1	3,68	3,16	2,86	2,80	0,83	0,87
GAS1	0,51	0,47	0,41	0,50	0,76	0,88
GPR49	0,24	0,21	0,24	0,21	0,72	0,73
HEY1	0,50	0,48	0,46	0,43	0,75	0,98
HLA-F	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
HNF4A	6,52	6,46	4,85	4,75	5,92	7,79
IF	50,20	44,32	104,53	55,49	1,22	1,08
IL18R1	11,27	10,38	11,59	8,00	0,92	1,09
IRS2	0,65	0,66	0,43	0,53	0,94	0,97
ITGA6	2,33	1,83	1,55	1,64	1,31	0,98
ITGB4BP_1	2,79	2,70	1,74	2,24	0,86	0,93
ITGB4BP_2	1,94	1,36	1,05	1,13	1,04	0,73
ITGB4BP_3	2,75	2,73	1,78	2,26	0,89	0,87
KIAA0152	2,31	2,03	1,53	1,78	0,74	0,87
KIFAP3	2,44	2,49	1,90	2,01	0,81	0,97
LASP1	3,02	2,87	2,47	2,44	0,96	1,10
LOC57228_1	7,37	6,64	5,54	4,91	0,95	1,08
LOC57228_2	136,66	97,00	81,99	38,14	1,37	0,48
MAN1A1	5,22	4,75	4,34	4,04	0,76	0,91
MAP3K11	7,08	6,34	4,88	5,56	1,31	1,00
MAPKAPK3	0,88	0,86	0,70	0,76	0,86	0,92
MCP	3,50	1,63	1,83	2,50	0,87	1,22
MGC33190	12,75	11,95	9,15	9,11	0,76	0,94
MGST2	3,32	2,72	2,09	2,28	0,98	0,80
MPP1	2,83	2,68	1,96	2,12	0,92	0,86
MTM1	3,33	3,01	2,93	3,28	0,81	1,02
NEFL	0,40	0,47	0,40	0,40	0,75	0,89
NELL2	2,79	2,57	1,94	1,96	1,11	0,93
NID	2,88	2,64	2,51	2,91	0,77	1,02
NK4	18,55	18,97	13,94	13,57	0,89	0,91
NNMT	0,20	0,03	< 0,05	0,96	1,69	0,22
NPR2L	0,89	0,82	0,89	0,80	0,79	0,90
NULL_1	4,91	3,10	3,29	3,48	0,90	1,11

NULL_2	11,28	9,47	6,96	7,53	0,88	1,23
OATPX	15,00	13,49	11,44	10,65	0,94	1,01
OGG1	4,28	4,28	2,99	3,07	0,72	0,85
OSBPL3	3,28	2,53	2,69	2,85	0,67	0,93
PEX3	2,85	3,11	2,09	2,25	0,86	0,98
PKP2	5,15	4,35	3,01	2,90	0,83	0,89
PPP1R1A	25,99	17,41	12,98	13,67	1,12	1,10
PRPH	8,76	1,39	1,97	1,11	2,43	1,50
RBSK	24,11	26,46	16,66	18,81	0,94	0,87
SC4MOL	1,78	1,63	1,51	1,30	0,91	0,95
SDC4	3,99	5,01	3,30	3,19	1,01	0,97
SEC23A	3,29	3,05	2,76	2,65	0,97	0,88
SELENBP1_1	5,89	4,71	4,73	4,54	1,10	1,02
SELENBP1_2	6,52	5,09	4,50	4,05	1,02	0,84
SEPP1	6,83	6,88	5,91	6,53	0,86	0,99
SLC7A5	0,92	0,79	0,52	0,67	0,79	0,97
SPP1	0,47	0,30	0,55	0,47	0,79	1,21
TACC2	5,51	5,18	3,82	3,65	0,79	0,92
TM4SF5	537,03	1167,34	297,80	722,11	< 0,05	< 0,05
TRAF4	3,95	3,47	2,39	2,16	0,88	0,99
TRIM9	0,53	0,46	0,45	0,48	0,68	0,93
UGDH	2,87	2,39	2,25	2,33	0,85	0,81
VIL1	124,72	194,97	191,64	304,15	0,51	2,11
WT1	3,57	3,42	2,95	2,89	0,58	0,79

Die Regulation der Gene in den Zelllinien HNF4 α wt #1, HNF4 α wt #4 und HNF4 α C106R #1 wurde nach 24 Std. Induktion mittels Real-time PCR analysiert. Die Ergebnisse sind als fold change angegeben. Bei der 1. RNA handelt es sich um die gleiche RNA wie bei der Mikroarray-Analyse. Die 2.RNA ist von einem anderen unabhängigen Experiment. Die Gene sind alphabetisch geordnet. Die Gene, die mit mehreren TaqMan Gene Expression Assays analysiert wurden, sind mit _1, _2 und _3 gekennzeichnet.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlichst bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, für die wissenschaftliche Betreuung meiner Promotion und die dabei gewährte Freiheit. Weiterhin danke ich ihm für die Hilfestellung bei der Verfassung meiner Publikation sowie für die Durchsicht dieses Manuskriptes und die Erstellung des Erstgutachtens.

Bei Dr. Ludger Klein-Hitpass möchte ich mich für die Durchführung der Mikroarrays, für die Ermöglichung des „TaqMan Low Density Array“-Experimentes und für die statistischen Auswertungen bedanken.

Ein großes Dankeschön an allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe! (Sabine Senkel, Heike Thomas, Silvia Bohn, Daniela Plitzko, Kenneth Simon, Guizhi Wu, Gülüzar Turan, Silke Erdmann, Kallal Pramanik, Tanja Arndt, David Nickol, Christoph Waldner, Rafael Bordes, Karen Grigo, Karin Dudziak, Magdalena Roose, Maria Eynck und Renate Dreher). Durch ihre ständige Hilfsbereitschaft und gute Laune schafften sie eine tolle Atmosphäre im Labor. Ohne sie wären die vielen Stunden im Labor schwerer und weniger unterhaltsam gewesen.

Insbesondere möchte ich mich bei Silke Erdmann und Karen Grigo für die sehr gute Zusammenarbeit in dem HNF4 α -Projekt bedanken.

Für Sabine Senkel ein sehr großes herzliches Dankeschön für die vielen hilfreichen praktischen Tipps und die Beantwortung meiner zahlreichen Fragen. Desweiteren will ich mich auch herzlich bei Gül Turan für die Einführung in der Anfangsphase und für ihre zahlreichen Hilfestellungen im Labor bedanken.

Klaus Lennartz möchte ich für die Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Messungen und bei allen Fragen rund um den Computer danken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie und Molekularbiologie für die zahlreichen Problemlösungen und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden ein riesengroßes Dankeschön für die liebevolle Unterstützung während meiner Promotionszeit aussprechen. Mein größter Dank gilt vor allem meinen Eltern. Ohne sie wäre mein Biochemie-Studium in Deutschland nicht möglich gewesen. Und meiner Zwillingschwester María danke ich für ihre wissenschaftliche Tipps und ständige persönliche Unterstützung über Tausende Kilometer hinweg.

Und zuletzt gilt mein allergrößter Dank meinem Mann Spiros für seine liebevolle Unterstützung während der ganzen Promotionszeit und für seine grenzenlose Liebe.
Σε ευχαριστώ πολύ αγάπη μου!

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

Publikationsliste

Belén Lucas, Karen Grigo, Silke Erdmann, Jörn Lausen, Ludger Klein-Hitpass and Gerhart U. Ryffel (2005). HNF4 α reduces proliferation of kidney cells and affects genes deregulated in renal cell carcinoma. *Oncogene*. **24**, 6418-6431

Sabine Senkel, Belén Lucas, Ludger Klein-Hitpass and Gerhart U. Ryffel (2005) Identification of target genes of the transcription factor HNF1 β and HNF1 α in a human embryonic kidney cell line. *Biochim Biophys Acta*.(zur Veröffentlichung angenommen)

Silke Erdmann, Sabine Senkel, Tanja Arndt, Belén Lucas, Jörn Lausen, Ludger Klein-Hitpass, Gerhart U. Ryffel and Heike Thomas (2005). The tissue specific transcription factor HNF4 α inhibits cell proliferation and induces apoptosis in the pancreatic INS-1 β -cell line. (zur Veröffentlichung eingereicht)

Postervorträge:

EMBO Workshop “Liver Development, Gene Regulation & Disease“ Crete - June 14-19, 2003

“Transcription factor HNF4 α : effects on cell proliferation and cell morphology”

Belén Lucas, Jörn Lausen, Ludger Klein-Hitpaß, Gerhart Ryffel

Lebenslauf

Name: Belén Lucas
Geburtsdatum: 16. April 1976
Geburtsort: Bilbao, Spanien
Nationalität: spanisch
Familienstand: verheiratet

SCHULAUSBILDUNG

1982-1986 spanische Grundschule in Bilbao, Colegio Zurbaran (Spanien)
1986-1994 Deutsche Schule Bilbao, San Bonifacio (Spanien)
Abschluss: Hochschulreife

HOCHSCHUL- UND BERUFSAUFBILDUNG

10/1994-07/1995 Zwei Semester Chemiestudium an der Universität von Baskenland (Spanien)
10/1995-01/2001 Biochemiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
04/2000-01/2001 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund (Abteilung Strukturelle Biologie), Prof. Dr. Wittinghofer, AG. Dr. Christoph Block. Thema: „Vergleich der Isoform-spezifischen Aktivierung von B-Raf und c-Raf durch Ras“
01/ 2001 Studienabschluß: Dipl.-Biochemikerin
04/2001-07/2001 Praktikum mit dem Programm „Leonardo da Vinci“ der Europäischen Gemeinschaft an der Universität von Kreta, Griechenland (Abteilung Kristallographie), Prof. Dr. Kokkinidis
seit 10/2001 Dissertation am Universitätsklinikum Essen, Institut für Zellbiologie (Abteilung Entwicklungsbiologie), Prof. Dr. Ryffel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema "Funktion des zellspezifischen Transkriptionsfaktors HNF4 α bei der Zellproliferation und Identifizierung von HNF4 α -regulierten Genen in Nierenzellen" zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Belén Lucas befürworte.

Essen, den 07.06.2005

Prof. Dr. Gerhart U. Ryffel

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 07.06.2005

Belén Lucas

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 07.06.2005

Belén Lucas